

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年10 月13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/094878 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 39/39, 31/24, 31/282, 31/704, 31/7064, 35/76, 38/00, 45/00, 47/18, 47/28, A61P 35/00, C07D 239/553, 487/14, 491/22, C07H 15/12, 15/252

府池田市旭丘 1-6-10-103 Osaka (JP). 黒岡正之 (KUROOKA, Masayuki) [JP/JP]; 〒5580053 大阪府大阪市住吉区帝塚山中 1-6-11 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006820

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2005 年3 月31 日 (31.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-108599 2004 年3 月31 日 (31.03.2004) JP  
特願2004-136756 2004 年4 月30 日 (30.04.2004) JP  
特願2005-044639 2005 年2 月21 日 (21.02.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ジェノミディア株式会社 (Genomidea, Inc.) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目 7 番 1 5 号 Osaka (JP). アンジェスMG株式会社 (ANGESMG, INC.) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目 7 番 1 5 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小谷 均 (KOTANI, Hitoshi) [JP/JP]; 〒5600011 大阪府豊中市上野西 4-8-30-501 Osaka (JP). 金田 安史 (KANEDA, Yasushi) [JP/JP]; 〒5620031 大阪府箕面市小野原東 6-12-8 Osaka (JP). 河野 博和 (KAWANO, Hirokazu) [JP/JP]; 〒5610882 大阪府豊中市南桜塚 4-13-8-407 Osaka (JP). 福村 正之 (FUKUMURA, Masayuki) [JP/JP]; 〒5630022 大阪府

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITION HAVING ANTITUMOR EFFECT

(54) 発明の名称: 抗腫瘍作用を有する組成物

(57) Abstract: It is intended to provide a medicinal composition for transferring a chemotherapeutic agent (preferably an anticancer agent) into a cell or a living body by using a virus envelope vector. For achieving this purpose, a medicinal composition characterized by containing, as the active ingredient, a chemotherapeutic agent encapsulated in and/or combined with a virus envelope vector capable of inducing immunity is provided. Thus, an anticancer agent, which has been encapsulated into a virus envelope vector, can be introduced directly into a tumor. By using together with another anticancer agent, it is possible to induce antitumor immunity specific to tumor cells caused by HVJ-E adjuvant, thereby reducing the tumor. Moreover, a medicinal composition characterized by containing, as the active ingredients, a virus envelope vector and a chemotherapeutic agent is provided.

(57) 要約: 本発明は、ウイルスエンベロープベクターを用いて細胞内あるいは生体内へ、化学療法剤、好ましくは抗癌剤を移入するための医薬組成物を提供することを目的とし、そのために免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入/併用した化学療法剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物を提供する。これにより抗癌剤をウイルスエンベロープベクターに封入し直接腫瘍に導入し、他の抗癌剤との併用により、HVJ-Eのアジュバント作用にも起因する腫瘍細胞特異的な抗腫瘍免疫を惹起でき、腫瘍を退縮させることができる。また、本発明はウイルスエンベロープベクターおよび化学療法剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物を提供する。

WO 2005/094878 A1

## 明細書

## 抗腫瘍作用を有する組成物

## 技術分野

本発明は、生体内で抗腫瘍免疫を惹起するためのビヒクルに関する。より詳しくは、ウイルス、不活性化ウイルス、特に不活性化センダイウイルス（以下、HVJともいう）に、化学療法剤、好ましくは抗癌剤を併用ないし封入して固形腫瘍内に導入し、さらに抗癌剤全身投与と併用することにより、より高い抗腫瘍免疫を惹起させることに関する。また、本発明は、ウイルスエンベロープと抗癌剤を含む抗腫瘍作用を有する医薬組成物に関する。

10

## 背景技術

現在の癌治療における治癒率は約 50%程度といわれ、その治癒は一般的には外科療法や放射線療法など局所療法によりもたらされる場合が多い。特に固形癌の治療においては、全身療法である化学療法が単独で治癒に貢献する割合は極めて少なく、各種療法と併用されるのが通常である。

一方外科療法では、全ての臓器癌の手術が可能となり、治療法として既に完成域に達していると考えられ、これ以上の治癒率向上は望めない。また放射線療法も感受性のある臓器癌の治療成績がほぼ一定率に達しており、同様にこれ以上の治癒率向上は望めない。

従ってこれらの治療法により、今後の癌治癒率の大幅な向上は期待しがたいため、癌の治癒率を現状の 50%からさらに改善し癌制圧に達するには、より優れた化学療法の開発が欠かせない。

化学療法に使用される抗癌剤は、癌細胞のような増殖能の高い細胞の殺細胞効果を目的としており、正常細胞、特に細胞増殖能の高い骨髄細胞等に与えるダメージが大きく、その結果患者に与える苦痛も大である。これは抗癌剤の送達法が注射剤による全身への投与であり、癌細胞以外の正常細胞にも抗癌剤が到達し、正常細胞が殺傷されホメオスタシスが機能しなくなるためである。

しかし現状では、抗癌剤を単独投与した際の効果は概ね 30%程度であるとされており、ゲノムの遺伝子情報解析研究が進められ適切な抗癌剤の選定が今後可能になることも期待されているが、現時点での抗癌剤療法は効果と比較して副作用が高いといわれている。

- 5 これは抗癌剤全身投与により正常細胞がダメージを受けたためである。よって、癌組織特異的な抗癌剤の導入、加えて癌細胞への取り込み方法が確立できれば、理想的な抗癌剤の送達システムとなる。さらに、抗癌剤のベシクル(vesicle)への封入が可能になれば、標的臓器・細胞選択的に、しかも正常細胞への影響(副作用)が少ない治療法を確立できる。また、これにより副作用が強く開発を断念した抗癌剤の再評価に結びつくものと考えられる。

- また、近年、悪性腫瘍に対する治療成績は化学療法を中心とする集学的治療の進歩によって著しく向上している。特に白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍においては、造血幹細胞移植などとの併用により治癒も十分に期待できるものとなっている。しかし、抗癌剤や放射線治療などによる毒性効果のみしか認められない場合があり、腫瘍細胞撲滅には限界がある。免疫機構による選択的腫瘍細胞排除が重要であることが基礎的研究ならびに臨床的観察より明らかになってきている。免疫機構は粘膜、非粘膜器官を問わずタンパク質(ペプチド)および糖質、脂質等の非ペプチド抗原を認識して作用する。病原体進入の際、主に単球が進入局所に遊走し、貪食作用などを介して抗原に非特異的な防御応答を行う。
- 15 糖質や脂質などの非ペプチド等に対する自然免疫がまず惹起され、病原体排除に関する種々の因子の産生を幫助する。その後病原体ペプチドを認識するリンパ球が増殖、分化し、B リンパ球は抗体産生細胞に分化し、T リンパ球が免疫系をコントロールするヘルパーT 細胞や細胞性障害 T 細胞などに分化し抗原特異的免疫応答、いわゆる獲得免疫を誘導する。獲得免疫には抗体が主体をなす体液性免疫と T リンパ球が主体となる細胞性免疫がある。免疫が細胞性免疫あるいは体液性免疫のどちらが主導になるかは、ヘルパーT 細胞の 2 つの亜集団である、Th1 あるいは Th2 のどちらが優位になるかによって決定される。免疫状態が Th1 に傾けば細胞性免
- 20
- 25

疫が優位になり、一方 Th2 に傾けば体液性免疫が優位になる。両者はお互いの免疫バランスの上に成り立っており、これら免疫状態は種々の細胞が分泌する液性分子であるサイトカインに依存している。Th1 型サイトカインとして IL-12、IFN  $\gamma$  などが、一方 Th2 型サイトカインとして、IL-4、IL-5 などが挙げられる。

- 5 免疫、特に腫瘍免疫を考える場合には、CD8 陽性細胞障害性 T 細胞 (CTL) および CD4 陽性ヘルパー T 細胞が非常に重要な役割を果たしていることが報告 (North RJ. 1984, Greenberg PD. 1991, Pardoll DM. 1998) されている。特に免疫された動物の CD8 陽性 T 細胞 (CTL) は、in vitro で直接標的細胞を障害し (Wanger H. 1980)、養子免疫による非免疫動物に腫瘍抵抗性を持たせることができた (North RJ. 1984, Greenberg PD. 1991) との報告がなされている。したがって、腫瘍特異的 CTL をいかに効率よく誘導できるかが抗腫瘍療法の開発において重要である。CTL による抗腫瘍免疫は T 細胞レセプターを介して、腫瘍細胞表面に発現された主要組織抗原 (major histocompatibility complex: MHC) クラス I 分子と腫瘍抗原由来ペプチドの複合体を CTL が認識し、パフォーリン等を腫瘍細胞に導入することに
- 10 よって細胞障害性を発揮する。腫瘍特異的 CTL 誘導には、まず腫瘍細胞特異的に発現され、細胞内でプロセスされてペプチド断片として MHC に提示されうる標的抗原ペプチドを同定することに主眼が置かれ、Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Library (SEREX) 法により高力値の IgG 抗体を産生する多くのペプチド分子が見出されている。
- 15 しかし、腫瘍ペプチドの同定のみで腫瘍免疫を語ることは困難である。同定されたペプチドを in vivo で細胞表面上に如何に効率よく提示させるかという点、co-stimulatory molecule である CD80/CD86 の発現など、残されている課題は多い。詳述すれば、効率的に当該ペプチドを発現させても co-stimulatory molecule である CD80/CD86 などの発現が低く、抗原シグナルのみが伝わった場合は抗原特異
- 20 的 T 細胞の増殖をきたさないばかりか、その抗原を発現する細胞に対する T 細胞 anergy に陥るとされている (Gribben JG. 1996)。白血病細胞においては、その増殖優位性を獲得する機序として多くの遺伝子異常が明らかになっており、このよ

うな遺伝子異常により形成された特異的異常タンパク質が発現し、プロセス断片化されたペプチドは細胞表面上MHCの溝に提示されると考えられている。しかし、多くの白血病細胞はこのような白血病特異的抗原を発現しているにも拘らず、その表面における CD80/CD86 などの co-stimulatory molecule の発現が不全なことから、白血病に対する有効な免疫反応を惹起することが難しいことが報告されている (Hirano N. 1996)。

また、最近の知見として CTL の上昇は認められるが腫瘍拒絶が起こらない理由として、腫瘍近傍に存在している stroma 細胞 (乳癌、すい臓癌、胃癌の腫瘍組織の 90%以上が間質線維芽細胞よりなる) により、免疫細胞、炎症細胞の浸潤の妨げ  
10 になっており、これらの障害を取り除くことにより腫瘍細胞の退縮効果が飛躍的な上昇したことが報告されており (Yu P. 2004)、腫瘍細胞への炎症細胞、免疫細胞の浸潤が腫瘍退縮に関しては重要な要因として考えられるようになってきている。

以上より腫瘍免疫を上手く利用するためには、腫瘍特異的な CTL を如何に効率よく惹起させることができるかにかかっており、その問題点として、以下の点が挙げられる。

- ・ 腫瘍特異的抗原が同定されているか
- ・ 腫瘍特異的抗原が同定されていない場合はどうするか
- ・ 免疫惹起細胞 (樹状細胞など) に如何に効率よく抗原提示をさせるか
- 20 ・ 免疫惹起細胞 (樹状細胞など) の成熟を如何に効率よく図るか
- ・ 以上踏まえた上で如何に腫瘍免疫 (CTL を中心とした) を惹起させるか
- ・ 免疫細胞の腫瘍組織効率的な浸潤

上記問題点のなかで、腫瘍免疫 (CTL を中心とした) を惹起させるかが最も重要な要件であり CTL の誘導には免疫惹起を誘発させるアジュバントが必要である。

25 免疫状態を Th1 にシフトできうるアンジュバンドとして「HVJ-電荷型リポソームからなるアジュバント」としての特許出願公開がされている (特開 2001-302541 号公報)。その腫瘍ワクチンとしての効果についても報告がなされている (Antica

ncer Res., (19):5367-5374. 1999, Ihshda H et al., Hum. Gene. Ther., (10):2719-2724. 1999, Zhou WZ. et al., Gene. Ther., (6):1768-1773. 1999. Zhou WZ. et al., Mol. Ther., 5(3), 291-299, 2002. Tanaka M. et al.). しかしながら、リポソームの形態ではないセンダイウイルスエンベロープ（以下、HVJ-Eともいう）に関してはこういった効果はいまだ報告されていない。

HVJ-EはHVJをもとに構築されたベクターであり（特開 2002-65278 号公報）、ベクタービヒクルの中にプラスミド、オリゴ DNA・RNA、タンパク質、ペプチド、低分子化合物を封入でき、in vitro および in vivo において当該封入試料をベクタービヒクル近傍の細胞へ導入でき、またエンベロープタンパク質である F タンパク質の働きにより細胞同士を融合させることが可能である。本発明者らは、上記利点を利用して HVJ-E を用いた腫瘍免疫について検討を行った。

癌の転移の抑制や再発の防止に最も適した遺伝子治療法は免疫遺伝子治療であるが、その効果は世界的にまだ十分に上がっていない。その原因のひとつとしては腫瘍免疫を治療に十分な程度に増強できないことが推察される。我々はこの課題を実現するために遺伝子導入ベクターや遺伝子発現方法の開発を行ってきた。

その結果、アジュバントとしての不活性化 HVJ エンベロープと抗癌剤を当該ベクターに封入ないし併用して固形腫瘍内に直接投与し、他の抗癌剤の併用投与により腫瘍特異的な抗腫瘍免疫を惹起させることが可能になった。その際腫瘍特異的な抗原ペプチドを必要としない、換言すれば腫瘍ペプチドが同定されていない広範な腫瘍に応用可能である。さらに CTL が惹起されているにもかかわらず、固形腫瘍組織を取り巻く stroma 細胞等により腫瘍部位に CTL 細胞が到達することができず、固形腫瘍の腫瘍細胞を殺傷できないことによって、腫瘍退縮が認められないという局面を HVJ-E と抗癌剤との併用により打破することができるという画期的な発明である。

25

#### 発明の開示

本発明者らは上記問題を解決すべく鋭意検討した結果、化学療法剤を併用ない

し封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する医薬組成物を完成させることができた。

さらに臨床応用により近い方法として、抗癌剤をウイルスエンベロープベクターに封入ないし併用して直接腫瘍内に導入し、他の抗癌剤との併用により、HVJ-E  
5 のアジュバント作用にも起因する腫瘍細胞特異的な抗腫瘍免疫を惹起でき、腫瘍を退縮させることができた。

従って本発明は具体的には、例えば外来遺伝子の封入能を有する不活性化 HVJ-E ベクター等の中に抗癌剤等を封入ないし併用した医薬組成物を提供するものである。

10 さらに、腫瘍内に抗癌剤を含有した HVJ-E ベクター等を導入し、抗癌剤投与との併用によりベクター自身のアジュバント効果にも起因する高い抗腫瘍免疫を惹起し、腫瘍を退縮させる方法を提供するものである。

また、本発明は、固形癌、特に泌尿器科領域の癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープおよびエンベロープに封入しない抗癌剤を含有してなる医  
15 薬組成物を提供する。

本発明の要点は4つある。

1 つは HVJ の使用である。HVJ のアジュバント効果によって腫瘍免疫の惹起を誘導させることである。

2 点目として HVJ-E を用いて腫瘍免疫を惹起させるために、全身投与していた  
20 シスプラチン(CDDP、ランダ注：日本化薬)と HVJ-E にブレオマイシン(塩酸ブレオマイシン、ブレオ注射用：日本化薬)を HVJ-E ベクターに封入し移植した腫瘍組織中に導入し、効率的な腫瘍免疫を惹起させることができた点にある。

さらに3点目として、惹起された CTL 細胞を非常に効率よく固形腫瘍中に集積できることが挙げられる。

25 また、誘導された腫瘍免疫は同種腫瘍細胞を排除する等、免疫本来の働きも保持しており、当該作用により転移した腫瘍の排除、さらには固形腫瘍を外科的に排除するために前もって当該処置をすることにより外科手術後の転移を防ぐ、そ

して腫瘍近傍転移リンパ節への転移腫瘍を殺傷し、外科的处理による除去部分を極力小さくするというような、いわゆるネオアジュバントとしての利用可能性を示した点にある。

- 4点目は、HVJ-E と HVJ-E に封入しない抗癌剤を併用することにより、有意な  
5 抗腫瘍効果が得られたことである。

すなわち、本発明は以下の通りである。

- (1) ウイルスエンベロープからなる免疫アジュバント。
- (2) 前記アジュバントが免疫応答を増強させるためのアジュバントである、(1)記載のアジュバント。
- 10 (3) 前記アジュバントが抗腫瘍免疫を増強させるためのアジュバントである、  
(1) または (2) 記載のアジュバント。  
(4) 前記ウイルスが、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、  
フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウ  
イルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュ  
15 ロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属する  
ウイルスである、(1) ないし (3) 記載のアジュバント。  
(5) 前記ウイルスがセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、ア  
デノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス  
またはインフルエンザウイルスから選ばれた1種である、(1) ないし (4) のア  
20 ジュバント。  
(6) 前記ウイルスがセンダイウイルスである、(1) ないし (5) 記載のアジュ  
バント。  
(7) 免疫アジュバントとして使用するためのウイルスエンベロープ。  
(8) 免疫アジュバントとして使用するためのセンダイウイルスエンベロープ。  
25 (9) 抗腫瘍免疫アジュバントとして使用するためのセンダイウイルスエンベロー  
プ。  
(10) 抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリ



ンパ球（CTL）細胞の腫瘍組織へ集積させるための、ウイルスエンベロープとシスプラチンの使用。

（11）抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球細胞の腫瘍組織へ集積させるための、ウイルスエンベロープ、シスプラチ

5 ンおよび化学療法剤の使用。

（12）前記ウイルスエンベロープがセンダイウイルスエンベロープ(HVJ-E)である、（10）または（11）記載の使用。

（13）前記化学療法剤がブレオマイシンである、（10）ないし（12）記載の使用。

10 （14）ウイルスエンベロープとシスプラチンを用いた、抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球細胞の腫瘍組織へ集積させる方法。

（15）ウイルスエンベロープおよびシスプラチンを含有してなる、抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球細胞の腫瘍組

15 織へ集積させるための医薬組成物。

（16）抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球細胞の腫瘍組織へ集積させるための医薬を製造するための、ウイルスエンベロープおよびシスプラチンの使用。

（17）免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入した化学療法  
20 剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

（18）化学療法剤が抗癌剤である、（17）記載の医薬組成物。

（19）化学療法剤がブレオマイシン類、アントラキノン系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、カンプトテシン類、シスプラチン類、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル(5-FU)およびその誘導体、ビラルビシンおよびそ  
25 れらの薬理学的に許容される塩から選ばれた1種以上である、（17）または（18）記載の医薬組成物。

（20）ブレオマイシン類が、ブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される

塩、あるいはペプロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、(17) ないし (19) 記載の医薬組成物。

(21) プレオマイシン類が、塩酸プレオマイシン、硫酸プレオマイシンまたは硫酸ペプロマイシンである、(17) ないし (20) 記載の医薬組成物。

- 5 (22) 免疫惹起能を有するウイルスが、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルス由来である、(17) ないし (21) 記載の医薬組成物。

(23) 前記ウイルスがセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルスまたはインフルエンザウイルスから選ばれた1種である、(17) ないし (22) 記載の医薬組成物。

- 15 (24) 化学療法剤が塩酸プレオマイシン、硫酸プレオマイシンまたは硫酸ペプロマイシンから選ばれた1種以上であり、ウイルスがセンダイウイルスである、(17) ないし (23) 記載の医薬組成物。

(25) 注射剤である (17) ないし (24) 記載の医薬組成物。

(26) 固形癌の治療剤である、(17) ないし (25) 記載の医薬組成物。

- 20 (27) 固形癌が、肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫または原発不明癌から選ばれた1種である、(26) 記載の医薬組成物。

(28) 消化器癌が胃癌、大腸癌または食道癌から選ばれた1種である、(27) 記載の医薬組成物。

- 25 (29) 頭頸部癌が上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌または口腔癌から選ばれた1種である、(27) 記載の医薬組成物。

(30) 婦人科領域の癌が子宮癌、卵巣癌または子宮頸癌から選ばれた1種であ

る、(27)記載の医薬組成物。

(31) 泌尿器科領域の癌が前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍または陰茎癌から選ばれた1種である、(27)記載の医薬組成物。

(32) 免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターを有効成分とし、化学療法剤との併用に供することを特徴とする医薬組成物。

(33) 免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターおよび化学療法剤を1製剤中に含有することを特徴とする、(32)記載の医薬組成物。

(34) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置するための、センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤を含有する医薬組成物。

(35) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置するための、センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤と、さらなる抗癌剤を含有する医薬組成物。

(36) センダイウイルスエンベロープがリポソームの形態でないことを特徴とする(34)または(35)記載の医薬組成物。

(37) 抗癌剤がブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペプロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、(34)ないし(36)記載の医薬組成物。

(38) 免疫促進剤が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むタンパク質である、(34)または(35)記載の医薬組成物。

(39) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置するための、センダイウイルスエンベロープを有効成分とし、抗癌剤または免疫促進剤との併用に供することを特徴とする医薬組成物。

(40) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置するための、センダイウイルスエンベロープを有効成分とし、抗癌剤または免疫促進剤並びにさらなる抗癌剤との併用に供することを特徴とする医薬組成物。

(41) センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤とを

含有する医薬組成物を投与することを含む、生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する方法。

- (42) センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤に加えてさらなる抗癌剤を含有する医薬組成物を投与することを含む、生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する方法。

(43) センダイウイルスエンベロープがリポソームの形態でないことを特徴とする(41)または(42)記載の方法。

- (44) 抗癌剤がブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペプロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、(41)ないし(43)記載の方法。

(45) 免疫促進剤が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むタンパク質である、(41)ないし(44)記載の方法。

- (46) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する医薬を製造するための、センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤の使用。

(47) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する医薬を製造するための、センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤とさらなる抗癌剤の使用。

- (48) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する薬剤組成物を製造するための、アジュバントとしてのセンダイウイルスエンベロープの使用。

(49) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する医薬を製造するための、アジュバントおよび抗癌剤または免疫促進剤封入ベクターとしての、センダイウイルスエンベロープの使用。

- (50) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する医薬を製造するための、アジュバントおよび抗癌剤または免疫促進剤送達ベクターとしての、センダイウイルスエンベロープの使用。

(51) 生体内において腫瘍免疫を惹起させるための、センダイウイルスエンベ

ローブと抗癌剤の併用。

(52) 固形腫瘍組織内に細胞傷害性Tリンパ球を導入し抗腫瘍効果を惹起するための、センダイウイルスエンベロープの使用。

(53) 生体内において抗腫瘍免疫を誘導する術前補助療法(ネオアジュバント療法)に用いるための、センダイウイルスエンベロープの使用。

(54) センダイウイルスエンベロープがリポソームでないことを特徴とする(46) ないし(53) 記載の使用。

(55) 抗癌剤がブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペプロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、(46) ないし(54)

10 記載の使用。

(56) 免疫促進剤が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むタンパク質である、(46) ないし(54) 記載のその使用。

(57) 泌尿器科領域の癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープおよび抗癌剤を含有してなる医薬組成物。

15 (58) 泌尿器科領域の癌が前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍または陰茎癌から選ばれた1種である、(57) 記載の医薬組成物。

(59) 抗癌剤がアドリアマイシン、ダウノマイシン、アクリルビシン、アムルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ピラルビシン、ダカルバジンまたはミトキサントロンから選ばれる少なくとも1種である、(57) または(58) 記載の

20 医薬組成物。

(60) 膀胱癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープとアドリアマイシンを含有してなる医薬組成物。

(61) 膀胱癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープとアドリアマイシンを含有してなる膀胱内注入用医薬組成物。

25 (62) 膀胱癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープとアドリアマイシンの併用。

(63) センダイウイルスエンベロープおよび抗癌剤を投与することを含む、泌

尿器科領域の癌を治療する方法。

(64) 泌尿器科領域の癌が前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍または陰茎癌から選ばれた1種である、(63)記載の方法。

(65) 抗癌剤がアドリアマイシン、ダウノマイシン、アクリルピシン、アムル  
5 ビシン、イダルピシン、エピルピシン、ピラルピシン、ダカルバジンまたはミトキサントロンから選ばれる少なくとも1種である、(63)または(64)記載の方法。

(66) 膀胱癌を治療するため医薬を製造するための、センダイウイルスエンベロープおよび抗癌剤の使用。

10 (67) 抗癌剤がアドリアマイシン、ダウノマイシン、アクリルピシン、アムルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ピラルピシン、ダカルバジンまたはミトキサントロンから選ばれる少なくとも1種である、(66)記載の使用。

(68) 泌尿器科領域の癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープを有効成分とし、抗癌剤との併用に供することを特徴とする医薬組成物。

15

#### 図面の簡単な説明

図1. 各群の腫瘍容量を比較したグラフである。

図2. CDDP と HVJ-E/BLM の単回および複数回投与の抗腫瘍効果を比較したグラフである。

20 図3. 同系腫瘍細胞再投与試験で、腫瘍免疫惹起効果を比較したグラフである。再投与は15日に行ったものである。

図4. 同系異腫瘍細胞再投与試験で、腫瘍免疫惹起効果を比較したグラフである。再投与は0日に行ったものである。

図5. CDDP と BLM を HVJ-E への封入の有無で投与した場合の抗腫瘍効果を比較し  
25 たグラフである。

図6. CTL assay による CTL の誘導をみたグラフである。

図7. 各腫瘍組織切片の HE 染色図である。(1)対照群[右上]、(2)HVJ-E 群[右下]、

(3)BLMのみ群[左上]、(4)HVJ-E/BLM群[左下]における、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色図である。

図8．(5)CDDPのみの群[右上]、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群[右下]、(7)CDDP+HVJ-E/BLM連続投与群[左上]における、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色図である。

図9．各群におけるCD-4陽性像を比較したグラフである。

図10．各群におけるCD-8陽性像を比較したグラフである。

図11．膀胱癌細胞接種マウスモデルにおける腫瘍容量の変化を、群間比較したグラフである。

10 図12．MB49細胞のアドリアマイシン感受性を示したグラフである。

図13．膀胱へのMB49細胞の浸潤像を示した顕微鏡写真である(第1群および第2群、倍率×400)。

図14．膀胱へのMB49細胞の浸潤像を示した顕微鏡写真である(第3群および第4群、倍率×400)。

15 図15．MB49の膀胱への生着率(癌の発生率)を群間比較したグラフである。

図16．CDDPおよびHVJ-E(卵由来)の併用による抗腫瘍効果を示したグラフである。

図17．CDDPおよびHVJ-E(細胞由来)の併用による抗腫瘍効果を示したグラフである。

20 図18a．IL-12に対する免疫惹起作用を示したグラフである。

図18b．IL-6に対する免疫惹起作用を示したグラフである。

図18c．IL-6とIL-12に対する免疫惹起作用の比較を示したグラフである。

図19．CD4+細胞の増減を示したグラフである。

25 図20．制御性T細胞(CD4+CD25+)の増減を示したグラフである。

発明の詳細な説明

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明におけるウイルスエンベロープとは、ウイルスから RNA または DNA を取り除いた膜であり、通常は遺伝子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、プラスミド等を封入して細胞移入(transfection)に利用されるものである。本発明

5 において好ましく用いられるウイルスエンベロープは、リボソームの形態であったも、リボソーム以外の形態であってもよいが、好ましくはリボソーム以外の形態である。

ウイルスの種類も限定されないが具体的には、例えばレトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルスを挙げることができる。

本発明にかかるウイルスとしてさらに具体的には、例えばセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワ  
15 クシニアウイルス、ポックスウイルス、インフルエンザウイルス等を挙げることができる。

これらの中でも、好ましくはマウス肺炎ウイルスの一つであるセンダイウイルス(Hemagglutinating Virus of Japan、以下 HVJ ともいう)を挙げることができる。

20 なお HVJ として具体的には、例えば VR-105, VR-907 等を American Type Culture Collection (ATCC。住所:P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, TEL[1]-703-365-2700) から購入することができる。

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,152376,VR-105&text=Sendai&max=20>

25 <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,1375478,VR-907&text=Sendai&max=20>

ウイルスエンベロープベクターについてより詳しくは、例えば特開 2001-28628



2号公報(W001/57204号公報)、特開2002-065278号公報、W003/014338号公報等に記載されており、具体的には例えば特開2001-286282号公報の実施例8などに従って調製することができる。

- これらのウイルスエンベロープは免疫アジュバントとして使用することができ、
- 5 免疫応答を増強させたり、抗腫瘍効果を増強させる効果を有する。またシスプラチンとともに使用することによって、抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球細胞を腫瘍組織へ集積させることができる。

ウイルスエンベロープを用いる主な利点を以下に詳述する。

- 上記した通り、ウイルスエンベロープの中でもセンダイウイルスエンベロープ
- 10 (以下、HVJ-Eともいう)が好ましく用いられるが、生ウイルスであるHVJに比べ、HVJ-Eでは抗原提示細胞である樹上細胞に対するサイトカインの誘導が低減される。特に、Th1サイトカインであるIL-12が低減されること、およびIL-6の誘導量はHVJに比べて約1/2に抑えられることが後述の実施例によりわかった。この場合でも、Th2サイトカインの上昇は見られな
- 15 い。以上のことより、HVJ-Eを用いる場合、サイトカインの誘導量は下がるが、樹上細胞のmaturation能は依然保持していることがわかった。

また、抗腫瘍免疫においては、制御性T細胞の割合が上昇すると、続いて起こる抗腫瘍免疫作用が抑制されることが報告されているが(Casares N. et al., J Immunol. 2003 Dec 1;171(11):5931-9., Takahashi T. et al., Int Immunol. 1

20 998 Dec;10(12):1969-80.)、HVJ-Eは、後述の実施例で示すとおり、T細胞全体の割合に影響を及ぼすことなく、制御性T細胞CD4+CD25+の割合を下げる作用を有している。この作用は抗癌剤によって影響を受けないため、HVJ-Eの使用は抗腫瘍免疫において非常に有用である。

- また、かかるウイルスエンベロープは、生体内において抗腫瘍免疫を誘導する
- 25 術前補助療法(ネオアジュバント療法)に用いることもできる。

さらにシスプラチンに加えて化学療法剤とともに用いてもよい。ここで用いる好ましい化学療法剤としてはブレオマイシンなどが挙げられる。

また、本発明のウイルスエンベロープにより副作用が大きな抗癌剤を、簡便に、しかも安全に癌部に送達できる方法が提供される。すなわち、本発明は、免疫惹起能を有するウイルスエンベロープに封入ないし併用した化学療法剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物を提供する。

5 本発明において使用される化学療法剤とは、細胞に直接作用する低分子化合物であれば限定されないが、例えば東京化学同人刊・生化学事典第3版には、「現在、選択毒性の高い化学物質を用いる治療法すなわち化学療法の対象は微生物による感染症のみならず悪性腫瘍にまで広げられている。」と記載されており、抗菌剤、抗癌剤等が含まれることは論を待たない。

10 なお本発明においては、化学療法剤として好ましくは抗癌剤および抗菌剤を挙げることができる。ここで、抗癌剤は、制癌剤、抗腫瘍剤と呼ばれているものを含む概念であり、本明細書において、抗癌、制癌、抗腫瘍は同義語として用いている。

抗癌剤として具体的には例えば、ブレオマイシン類、アドリアマイシン(ドキソルビシン)・ダウノマイシン(ダウノルビシン)・アクリルビシン・アムルビシン・イダルビシン・エピルビシン・ピラルビシン・ミトキサントロン等のアントラキノ(アントラサイクリン)系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、イリノテカン等のカンプトテシン類、シスプラチン類、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル(5-FU)およびその誘導体、ビラルビシン、ダカルバジンおよび  
15 それらの薬理学的に許容される塩を挙げることができる。

これら化学療法剤の中でも、より好ましくは抗癌剤、さらに好ましくはブレオマイシン類、シスプラチン類またはアドリアマイシンを挙げることができ、具体的にはブレオマイシン(Bleomycin)またはその薬理学的に許容される塩、あるいはペプロマイシン(Peplomycin)またはその薬理学的に許容される塩を挙げることが  
25 でき、さらに詳しくは塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシンを挙げることができる。

なお本発明におけるシスプラチン類とは、具体的には例えばシスプラチン (cisplatin)

splatin:CDDP)、カルボプラチン (carboplatin [paraplatin]:CBDCA)、ネダプラチン(nedaplatin)等の制癌性白金錯体を意味する。

抗菌剤として具体的には、例えばオキシリン酸、オルメトプリム(ormetoprim: OMP)、トリメトプリム(trimethoprim)、サルファ剤、ホスホマイシン、ペニシリン系抗菌剤、セファロスポリン系抗菌剤、バンコマイシン、テトラサイクリン系抗菌剤、リファンピシン、フルオロキノロン系抗菌剤などが挙げられる。

本発明にかかる医薬組成物を抗癌剤として使用する場合、適応となる癌の種類は限定されず、具体的には固形癌、血液細胞癌等を挙げることができる。これらの中でも固形癌が好適対象である。

- 10 固形癌としてより具体的には、例えば肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌、皮膚癌、皮膚悪性腫瘍、神経膠腫、甲状腺癌等を挙げることができ、さらに具体的には、例えば消化器癌として胃癌、大腸癌、食道癌等を、頭頸部癌として上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、口腔癌等を、婦人科領域の癌として子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌等を、泌尿器科領域の癌として前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍、陰茎癌等を挙げることができる。

- これらの固形癌の中でも、より好適な対象としては、皮膚癌、皮膚悪性腫瘍、頭頸部癌(上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、口腔癌など)、肺癌(特に原発性および転移性扁平上皮癌)、食道癌、悪性リンパ腫(細網肉腫、リンパ肉腫、ホジキン病など)、子宮頸癌、神経膠腫、甲状腺癌、前立腺癌、膀胱癌を挙げることができる。

上記の医薬組成物が含有するウイルスエンベロープには、さらに免疫促進剤を封入ないし併用してもよい。ここで、好ましい免疫促進剤としては、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むタンパク質などが挙げられる。

- 本発明の抗癌剤または免疫促進剤を含有する医薬組成物は生体内において抗腫瘍免疫を誘導し、固形腫瘍を処置することもできる。ここで、「処置する」とは、固形腫瘍を治療・抑制するための行為を指し、具体的には、該医薬組成物を患部に直接注入したり、全身に投与したりすることなどによって、固形腫瘍を退縮・

消滅させることなどを意味する。

なお化学療法剤または免疫促進剤をウイルスエンベロープに封入する工程においては界面活性剤を使用することが好ましく、界面活性剤として具体的には、例えばトリトン(Triton) X100、デオキシコール酸またはその塩、コール酸またはその塩、ドデシルマルトシド等を挙げることができる。またデオキシコール酸の塩として好ましくはデオキシコール酸ナトリウム、コール酸の塩として好ましくはコール酸ナトリウムを挙げることができる。

具体的には、不活性化センダイウイルスエンベロープ (HVJ-E) の場合を例にとると、HVJ-E に抗癌剤または免疫促進剤を封入する場合には、抗癌剤または免疫促進剤を緩衝液に溶解する。ここで使用する緩衝液は限定されず、具体的には例えば、TE 緩衝液(10mM トリス、1mM EDTA[pH8.0])、PBS(リン酸緩衝液)等を適宜選択し使用できるが、pH が 6-9 の緩衝液が好ましい。

上記の医薬組成物にはウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤に加え、さらなる抗癌剤を含有させてもよい。さらに含有させる抗癌剤としては、具体的には、例えば前述の抗癌剤の例示と同様のものなどを挙げることができる。

上記の医薬組成物の投与形態・剤型は、経口投与、非経口投与のいずれでもよく、経口投与剤としては、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、チュアブル剤などの固形剤、溶液剤、シロップ剤などの液剤が、また、非経口投与剤としては、注射剤、軟膏、スプレー剤などが挙げられる。好ましくは非経口投与、さらに好ましくは注射剤である。

ヒト以外の動物としては、家畜、家禽類のほか、実験動物が含まれる。ヒト以外の動物への投与形態としては、飼料中への添加であってもよい。

上記医薬組成物の投与量は、対象患者の年齢・体重・病態、投与方法などによっても異なるが、成人当たりの 1 日量として、抗癌剤を封入したウイルスエンベロープの組成物において、抗癌剤が例えばブレオマイシンの場合、通常 15~30mg 力価を、シスプラチンの場合、通常 10~100mg/m<sup>2</sup> 程度投与するのが好ましい。また、

免疫促進剤を封入したウイルスエンベロープの組成物においては、例えば GM-CSF の場合、通常 100 万から 2,000 万単位程度投与するのが好ましい。

また HVJ-E として通常は、40～400,000HAU を、好ましくは 1,200～120,000HAU を、さらに好ましくは 4,000～40,000HAU を投与する。

- 5 抗癌剤を封入ないし併用したウイルスエンベロープに加えてさらなる抗癌剤を含有する医薬組成物の場合、抗癌剤を封入ないし併用した HVJ-E とさらに添加する抗癌剤は、それぞれが単独で、若しくは組み合わせで製剤化されてもよく、又は全てを含有する製剤としてもよい。別々に製剤化して投与する場合、それらの投与経路、投与剤形は同一であっても異なってもよく、また各々を投与する
- 10 タイミングも、同時であっても別々であってもよい。併用する抗癌剤の種類や効果によって適宜決定する。

なお本発明における「併用」とは、その投与のタイミングが同時であっても、別々であってもよく、限定されないものとする。

- 上記の医薬組成物は、通常の方法によって、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、
- 15 チュアブル剤などの固形剤、溶液剤、シロップ剤などの液剤、または、注射剤、スプレー剤、軟膏などに製剤化することができる。

- 製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、滑沢剤、溶剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、矯味矯臭剤、着色剤などを配合して製剤化
- 20 される。

- 賦形剤としては、乳糖、ブドウ糖、D-マンニトールなどの糖類、でんぷん類、結晶セルロースなどのセルロース類などの有機系賦形剤、炭酸カルシウム、カオリンなどの無機系賦形剤などが、結合剤としては、 $\alpha$  化デンプン、ゼラチン、アラビアゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、D-マンニトール、トレハロース、
- 25 ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなどが、滑沢剤としては、ステアリン酸、

- ステアリン酸塩などの脂肪酸塩、タルク、珪酸塩類などが、溶剤としては、精製水、生理的食塩水などが、崩壊剤としては、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、化学修飾されたセルロースやデンプン類などが、溶解補助剤としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、トレハロース、安息香酸ベンジル、
- 5 エタノール、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが、懸濁化剤あるいは乳化剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム、アラビアゴム、ゼラチン、レシチン、モノステアリン酸グリセリン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油な
- 10 どが、等張化剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン、尿素などが、安定化剤としては、ポリエチレングリコール、デキストラン硫酸ナトリウム、その他のアミノ酸類などが、無痛化剤としては、ブドウ糖、グルコン酸カルシウム、塩酸プロカインなどが、防腐剤としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デ
- 15 ヒドロ酢酸、ソルビン酸などが、抗酸化剤としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸などが、矯味矯臭剤としては、医薬分野において通常に使用される甘味料、香料などが、着色剤としては、医薬分野において通常に使用される着色料が挙げられる。

- 本発明の特長として、副作用あるいは毒性の強い抗癌剤をウイルスエンベロー
- 20 プベクターに封入し、*in vitro* 実験では培養液中に抗癌剤がもれることなく直接細胞に抗癌剤を送達することもできる。

また *in vivo* 動物実験においては、抗癌剤の全身投与ではなく、局所投与を行うことが可能であり、固形癌の癌細胞のみに効率よく抗癌剤を送達することができる。

- 25 さらにヒトの治療においては、抗癌剤封入／併用ウイルスエンベロープベクターの単独投与による化学療法だけではなく、進行癌患者で抗癌剤の投与不能な患者に対し局所投与を行うことにより癌の退縮を図り、さらに放射線治療、外科的処

理との併用により、一層優れた抗癌効果が得られる。

例えば膀胱癌に対しては、膀胱内注入等の局所投与することもできる。

抗癌剤を併用ないし封入したウイルスエンベロープベクターは、*in vitro* 実験では宿主細胞にトランスフェクションする。その場合の手続きは、例えば抗癌  
5 剤を封入／併用したウイルスエンベロープベクターの溶液を培養細胞の培地に添加するなどの方法を採用することができる。

トランスフェクションは 37℃で反応させる場合、その反応時間は 30 分以上、48 時間程度とする。効果判定は生細胞数のカウントあるいは WST assay (生細胞のカウント手法：cell counting kit-8、同仁化学)により行うのが好ましい。

10 *in vivo* 動物実験における対象には、例えばマウスの場合、癌細胞が同系移植では免疫不全マウスではない通常マウスを、異種移植の場合はヌードマウスあるいは SCID マウスを使用するのが好ましい。

ペトリディッシュで培養した培養癌細胞をマウスの皮内に移植し、移植細胞が増殖後、抗癌剤を封入／併用したウイルスエンベロープベクターを増殖固形癌部  
15 内に投与し、癌部の長径および短径を測定し、その抗癌効果測定をするなどの方法を採用することができる。

さらに本発明は、HVJ-E と抗癌剤を含有してなる医薬組成物を提供する。  
この場合、上述したようなウイルスエンベロープへの抗癌剤の封入処理を行わな  
20 なくてもよい。

かかる医薬組成物に含有させる抗癌剤としては、ブレオマイシン類、アドリアマイシン(ドキソルビシン)・ダウノマイシン(ダウノルビシン)・アクリルビシン・アムルビシン・イダルビシン・エピルビシン・ピラルビシン・ミトキサントロン等のアントラキノン(アントラサイクリン)系制癌剤、マイトマイシン類、アクチ  
25 ノマイシン類、イリノテカン等のカンプトテシン類、シスプラチン類、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル(5-FU)およびその誘導体、ピラルビシン、ダカルバジンなどが挙げられ、特に好ましくはブレオマイシン類、シスプラチン類ま

たはアドリアマイシンを用いる。

本発明にかかる医薬組成物を抗癌剤として使用する場合、適応となる癌の種類は限定されず、具体的には固形癌、血液細胞癌等を挙げることができる。これらの中でも固形癌が好適対象である。

- 5 固形癌としてより具体的には、例えばメラノーマ、大腸癌等の消化器癌、乳癌、肺癌、泌尿器科領域の癌を治療するのに適している。泌尿器科領域の癌としてさらに具体的には前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍または陰茎癌などを挙げることができる。

- 10 上記医薬組成物はHVJ-Eおよび抗癌剤を含むものであるが、それぞれが単独で、若しくは組み合わせで製剤化されてもよく、又は全てを含有する製剤としてもよい。別々に製剤化して投与する場合、それらの投与経路、投与剤形は同一であっても異なってもよく、また各々を投与するタイミングも、同時であっても別々であってもよい。併用する抗癌剤の種類や効果によって適宜決定する。

- 15 上記の医薬組成物の投与形態・剤型としては、先述の医薬組成物と同様の形態・剤形などが挙げられ、好ましくは注射剤である。

ヒト以外の動物としては、家畜、家禽類のほか、実験動物が含まれる。ヒト以外の動物への投与形態としては、飼料中への添加であってもよい。

- 20 上記医薬組成物の投与量は、対象患者の年齢・体重・病態、投与方法などによっても異なるが、例えばアドリアマイシンとHVJ-Eを含有する医薬組成物の場合、成人当たりの1日量として、通常HVJ-Eを40～400,000HAU、アドリアマイシンを1～500mgを、好ましくはHVJ-Eを4,000～40,000HAU、アドリアマイシンを30～60mg程度投与する。

上記の医薬組成物は、先述したような通常の方法によって、製剤化することができる。

25

#### 実施例

続いて、本発明による免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封



入／併用した化学療法剤を有効成分として含有する医薬組成物が有する優れた効果、特にウイルスエンベロープベクターのウイルスエンベロープ糖タンパク質等によるアジュバントによる優れた効果を示すため、具体的実施例を挙げるが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

## 5 (実施例 1)

### (1) 試験デザイン

8 週齢の BALB/cAnNCrj 系雄マウスの背部皮内に、マウス大腸癌由来の CT-26 細胞 ( $5 \times 10^6$  細胞) を移植し、担癌マウスを作製した。移植 5 日後に腫瘍径 (長径) が 5mm 程度に達した動物の腹腔内に 0.2mg/body のプラトシン注 (シスプラチン, CDDP) を投与した。投与日後に、単回 (投与翌日) あるいは複数回 (3 回 : 投与 1, 5, 8 日後)、抗癌剤 (塩酸ブレオマイシン [BLM] : 日本化薬) 含/不含 HVJ-E 等を腫瘍内に投与した。腫瘍径、生存曲線、腫瘍組織における免疫反応について検討した。

さらに担癌マウスに当該処置を施したマウスに、CT-26 細胞あるいは同系マウス由来 Meth-A 細胞を移植し移植細胞の動態を観察した。

15

(試験 1) 以下記載の群設定を行い、移植腫瘍における当該処置の抗腫瘍効果について検討した。

モデル設定として、(1) 対照群、(2) HVJ-E 群、(3) BLM のみ群、(4) HVJ-E/BLM 群、(5) CDDP のみ群、(6) CDDP HVJ-E/BLM 単回投与の各群を設定し、それぞれについてした場合の 21 日後の腫瘍容量の測定を行い抗腫瘍効果に及ぼす影響を調べた。

当該群構成および投与用量等について以下に詳細した。

群	被験物質	被験物質
	腹腔内投与	腫瘍内投与
25	(mg/body)*	( $\mu$ g/腫瘍)**
対照群	生理食塩液 0	生理食塩液 0

HVJ-E 群	生理食塩液	0	HVJ-E	0
6.5 $\mu$ g/tumor BLM 群	生理食塩液	0	BLM	6.5
6.5 $\mu$ g/tumor HVJ-E/BLM 群	生理食塩液	0	HVJ-E/BLM	6.5
0.2mg/body CDDP 群	CDDP	0.2	生理食塩液	0
5 0.2mg/body CDDP-6.5 $\mu$ g/tumor HVJ-E/BLM 群	CDDP	0.2	HVJ-E/BLM	6.5

\* : シスプラチン(CDDP)として

\*\* : プレオマイシン(BLM)として

10

(試験 2) 試験 1 においてした場合の当該 CDDP HVJ-E/BLM 単回投与(単回)処置における抗腫瘍効果の更なる増強を鑑み、HVJ-E/BLM の複数回(3回)投与を行った(試験. 2-1)。さらに当該試験において抗腫瘍免疫により腫瘍の退縮が起こった場合、当該惹起免疫の種類の推定を行うため、腫瘍細胞 (CT26 細胞(試験. 2-2)および B

15 ALB/c マウス肉腫細胞である Meth-A 細胞(試験. 2-3)) の再投与を行い、当該移植細胞の生着、腫瘍用量の増減について調べた。

(試験 2-1)

(1) 対照群、(2)CDDP HVJ-E/BLM 単回投与群(単回)、(3)CDDP HVJ-E/BLM3 回投与

20 群の 21 日後の腫瘍容量について検討を行った。

群	腹腔内投与 (mg/body)*	腫瘍内投与 ( $\mu$ g/腫瘍)**
25 対照群	生理食塩液 0	生理食塩液 0
0.2mg/body CDDP-6.5 $\mu$ g/tumor HVJ-E/BLM 投与群	CDDP 0.2	HVJ-E/BLM 6.5

0.2mg/body CDDP-6.5  $\mu$ g/tumor CDDP 0.2 HVJ-E/BLM 6.5 $\times$ 3  
 3回 HVJ-E/BLM 投与群

\*: シスプラチン (CDDP) として

5 \*\*: プレオマイシン (BLM) として

(試験 2-2)

細胞の再移植を行なう前までは上記試験と同様の処置を実施し、CDDP の投与 15 日後に初回腫瘍細胞移植隣接部に CT-26 細胞および Meth-A 細胞 ( $5 \times 10^6$  個細胞)

10 をそれぞれ皮内に移植し、再移植細胞の拒絶について調べた。

群	再投与細胞	再投与細胞
	CT-26	MethA
15 対照群 1 (初発 CT26 投与あり)	○	○
対照群 2 (初発 CT26 投与なし)	○	
初発 0.2mg/body CDDP-6.5 $\mu$ g/tumor	○	
HVJ-E/BLM 投与群		
初発 0.2mg/body CDDP-6.5 $\mu$ g/tumor	○	○
20 3回 HVJ-E/BLM 投与群		

(試験 3) 試験 2 の結果を補足する試験として、直接腫瘍内に封入量と同等量換算の BLM を投与しその効果についての検討を行った。

群	腹腔内投与		腫瘍内投与	
	(mg/body)*		(μg/腫瘍)**	
5	0.2mg/body	CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP	0.2
	3回 HVJ-E/BLM 投与群		HVJ-E/BLM	6.5×3
	0.2mg/body	CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP	0.2
	3回 BLM のみ投与			6.5×3

10 \*: シスプラチン (CDDP) として

\*\* : プレオマイシン (BLM) として

#### (試験 4) CTL assay

当該試験においてした抗腫瘍免疫効果が、CT26 細胞特異的な抗腫瘍免疫の惹起  
 15 においてされているかどうかの検討を行うため、動物より回収した脾臓細胞を CT  
 26 細胞で刺激し、放射ラベルしたクロムを用いた CTL assay を行い、CT26 特異的  
 な抗腫瘍免疫が惹起されているかについて検討した。

係る試験において、(1)CT-26 細胞未接種群、(2) CT-26 細胞のみ接種群、(3)  
 CT-26 細胞接種+CDDP 投与群、(4) CT-26 細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3 回投与群を  
 20 それぞれ作製し試験に供した。

(試験 5) 当該抗腫瘍免疫による抗腫瘍効果についての試験においてした腫瘍組織  
 における CD-4、CD-8、好中球、マクロファージ等の浸潤を調べるため以下に示す  
 試験群を設定し、CDDP 投与 9 日後の腫瘍組織を摘出し、組織免疫染色を行った。

群	腹腔内投与		腫瘍内投与	
	(mg/body)*		(μg/腫瘍)**	
5 対照群	生理食塩液	0	生理食塩液	0
HVJ-E 投与群	生理食塩液	0	HVJ-E	0
6.5 μg/tumor BLM のみ投与群	生理食塩液	0	BLM	6.5
6.5 μg/tumor HVJ-E/BLM 投与群	生理食塩液	0	HVJ-E/BLM	6.5
0.2mg/body CDDP 投与群	CDDP	0.2	生理食塩液	0
10 0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP	0.2	HVJ-E/BLM	6.5
HVJ-E/BLM 投与群				
0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor	CDDP	0.2	HVJ-E/BLM	6.5×3
3 回 HVJ-E/BLM 投与群				

15

## (2) 実験方法

## 2-1) 腫瘍細胞の培養

BALB/c マウス大腸癌由来 CT-26 細胞を、10%FBS 含有 DMEM 培地を用い、37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

- 20 75cm<sup>2</sup> のフラスコを用いて細胞培養を行った。約80%コンフルエントに達した後、継代培養を行った。DMEM (10%FBS 含有) 液を除去後、10mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を洗浄し、1mL の 0.25%トリプシンおよび 1mmol/L EDTA-2Na 含有 PBS を添加し、37℃で細胞を剥離した。9mL の DMEM 培地を添加後、細胞を集め、遠心分離 (1000rpm, 5 分間) にて細胞を回収した。上清除去後、10%FBS 含有 DMEM 培地にて細胞を希釈し、培養した。

BALB/c マウス Meth-A 細胞は 10%FBS 含有 DMEM 培地を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

## 2-2) 腫瘍細胞懸濁液の調製

約 80%コンフルエントに達した細胞の培養液を除去後、PBS を用いて、培養フラスコを洗浄した。0.25%トリプシンおよび 1mmol/L EDTA-2Na 含有 PBS を少量添加し、37℃で細胞を剥離し始めるまで放置した。DMEM 培地を用いて細胞を集め、遠心分離(1000rpm, 5 分間)した。上清を除去後、PBS に懸濁した。再度遠心分離(1000rpm, 5 分間)し、上清を除去後、PBS を用いて  $5 \times 10^7$  個/mL に調製した。

## 2-3) マウスの馴化

16 日間の検疫馴化期間中、固型飼料および飲水を自由に与えた。

10

## 2-4) 腫瘍細胞の接種

検疫馴化が終了した動物にバリカンを用いて剃毛を実施した。マウスの背部に、ディスポーザブル注射筒および注射針(26G)を用いて、 $100 \mu\text{L}/\text{site}$  ( $5 \times 10^6$  個/body) を 59 匹の動物に皮内投与した。投与した翌日に 57 匹の動物(未投与動物)に同様に投与した。

## 2-5) 動物の群分け

腫瘍の径(長径、短径)を、移植後 5 日目に測定(群分け後は測定しなかった)した。5 日後に腫瘍径(長径)が 5mm 程度になった動物を、平均腫瘍径(長径)がほぼ均一になるよう、層別無作為化によって群分けした。

## 2-6) 投与

ディスポーザブル注射筒および注射針を用いて、CDDP 投与群については 1 回腹腔内投与( $1000 \mu\text{L}$ )した。腫瘍内試料投与群においては、CDDP 投与日後に所望試料を腫瘍内に投与( $100 \mu\text{L}$ )した。

## 2-7) 腫瘍径の測定

投与日を投与後 0 日とした。投与後 3, 6, 9, 12, 15, 18 および 21 日に、全例について腫瘍径を計測し、腫瘍体積(長径×短径×短径÷2)を算出した。

CT-26 細胞および Meth-A 細胞の再投与においても再投与後の腫瘍径を測定した。

#### 5 2-8) CTL assay

麻酔下の動物より脾臓を取り出し、3ml の RPMI 溶液の入った 6cm 径ペトリディッシュに回収した。滅菌した 2 枚のスライドガラスのすり部分で脾臓組織をすりつぶし、極力皮膜より脾臓細胞を分離し、残渣はメッシュにより除去した。7ml の RPMI 溶液を加えて 1200rpm、10 分間遠心し上清を除去した。さらに 10ml の RPMI 溶液を加えて洗浄した。再度洗浄操作を行い、当該操作により得られた細胞を 5ml の GIT (10%FCS 及び抗生剤含有) 溶液に懸濁した。当該操作で得られた細胞の数を測定した。当該細胞を  $5 \times 10^6$  細胞/ml に調整し、12well plate に 2ml/well となるように細胞を撒種した。当該 well に刺激細胞として CT-26 細胞を添加した。当該刺激細胞の作製は、 $1 \times 10^7$  細胞/ml に調整した刺激細胞含有 GIT 溶液に 100  $\mu$ l のマイトマイシン C を添加し 1 時間、37℃にて処理した。当該処理後 9ml の GIT 溶液を加え、1000rpm、5 分間遠心し、上清を除去後、10ml の GIT 溶液を加えて洗浄操作を行い、当該操作をさらにもう一度行い、最後に 1ml の GIT 溶液に細胞を懸濁することにより調整した。当該細胞を細胞密度が GIT 溶液を添加することにより、 $2.5 \times 10^5$  細胞/ml になるように調整し、前述の脾臓組織より回収した細胞懸濁液中に該溶液 2ml を添加した。

刺激細胞なし試料では GIT 溶液のみを 2ml を添加した。当該試料を 6 日間培養した。CTL assay においては当該細胞をターゲットとして使用した。

該組織より回収した脾臓細胞の培養試料を用いて CTL assay を行った。まずターゲット細胞として使用する CT-26 細胞の調整を以下のように行った。CT-26 細胞を  $1 \times 10^7$  細胞/ml (GIT 培地中) となるよう調整し 150  $\mu$ l を取り、該溶液に 1mCi/ml の放射ラベルした Cr 溶液 150  $\mu$ l を加え、1 時間 37℃にて培養した。10ml の GIT 溶液を加えて細胞を洗浄し、1000rpm、5 分間遠心し細胞を回収した。上清を

除去し 10ml の GIT 溶液を加えて洗浄した。都合 3 回同操作を行い洗浄を行った。当該操作により得られた細胞を 150  $\mu$ l の GIT 溶液に懸濁し、最後に 100 倍希釈し 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 細胞/ml となるよう調整し、ターゲット細胞 (T) として以下の操作に用いた。

- 5 エフェクター細胞 (E) は方法の部分で示した 4 群からの処理した細胞を回収し、調整し用いた。

実際の CTL assay は、エフェクター細胞 (E) とターゲット細胞 (T) との比、E/T 比がそれぞれ 80、40、20、10、5 にし測定を行った。この際、ターゲット細胞は 100  $\mu$ l (1 $\times$ 10<sup>5</sup> 細胞/ml) を加え、全量を 200  $\mu$ l とした。当該試料を 4 時間 37℃ で処理した。

培養終了後、遠心により細胞および残渣を除去し、100  $\mu$ l を回収し、 $\gamma$ -カウンターに入れ計測した。以下の式により % specific Cr release を算出した。

$$\% \text{ specific Cr release} = b - c / (a - c) * 100 (\%)$$

a: maximum release (cpm)

- 15 b: experimental release (cpm)

c: spontaneous release (cpm)

- 2-9) 当該腫瘍組織は腫瘍組織染色を行うために液体窒素中で凍結した。腫瘍組織をクライオスタットで 8  $\mu$ m 厚切片を作製した。組織切片を -20℃ の冷アセトン中で 15 分間固定した。水洗後内因性アビジン・ビオチンのブロッキングを行い水洗した。試料を正常ウサギ血清により反応を行い、50 倍希釈した一次抗体 (抗マウス CD8a・ラット抗体 (Ly-2; Pharmingen)、抗マウス CD4a・ラット抗体 (L3T4; Pharmingen)) と 4℃、一晩反応させた。7.5mM トリス緩衝液 (pH7.5) で洗浄後、300 倍希釈した抗ラット・ビオチン標識ウサギ Ig (DAKO) と 30 分間反応させた。9.5 mM トリス緩衝液 (pH7.5) で洗浄後、100 倍希釈のストレプトアビジンと 30 分間反応させた。11.5mM トリス緩衝液 (pH7.5) で洗浄後、ファーストレッドにより発色させた。水洗後ヘマトキシリンで核染色を行った。



## 結果

### 試験 1 の結果

(1)対照群、(2)HVJ-E 群、(3)BLM のみ群、(4)HVJ-E/BLM 群、(5) CDDP のみ群、(6)CDDP+HVJ-E/BLM 単回投与群の腫瘍容量を測定した。

- 5 試験は各群合計 10 匹とし 5 匹ずつ 2 回に分けて試験を行った。当該試験において特筆すべきことは(6)CDDP+HVJ-E/BLM 単回投与群において当該試験動物 10 匹のうち 2 匹のマウスにおいて外見上移植した腫瘍細胞が消え、寛解したことである。
- 2 回試験した内 1 の試験において 5 匹の動物の腫瘍容量の平均値をグラフに示した。それぞれの平均腫瘍容量は、(1)対照群：1641mm<sup>3</sup>、(2)HVJ-E 群：1386mm<sup>3</sup>、(3)BLM のみ群：1303mm<sup>3</sup>、(4)HVJ-E/BLM 群：718mm<sup>3</sup>、(5)CDDP のみ群：387mm<sup>3</sup>、(6)CDDP+HVJ-E/BLM 単回投与群：51mm<sup>3</sup>となった。対照群の平均腫瘍容量を 100%とし、各群の平均値を比較すると、(2)HVJ-E 群、(3)BLM のみ群、(4)HVJ-E/BLM 群、(5)CDDP のみ群、(6)CDDP+HVJ-E/BLM 単回投与群はそれぞれ、82.9%、80.0%、43.0%、23.2%、3.1%となった(図 1)。

15

### 試験 2-1 の結果

- (1)対照群、(2)CDDP+HVJ-E/BLM 単回投与群、(3)CDDP+HVJ-E/BLM3 回投与群 (CDDP 投与後の HVJ-E/BLM 投与日、1, 5, 8 日後) モデルを作製し、当該(2)CDDP+HVJ-E/BLM 単回投与群と(3)CDDP+HVJ-E/BLM3 回投与群における腫瘍拒絶について効果
- 20 果を調べた。

まず図に示すように、(2)群で 4 匹中 1 匹のマウスで寛解が認められた。(3)群では 5 匹中 4 匹で寛解が認められた。(図 2)

### 試験 2-2 および 2-3 の結果

- 25 試験 2-2 でした同系腫瘍細胞 (CT-26 細胞) 再投与試験において、CDDP+HVJ-E/BLM 単回投与群で 4 匹中 1 匹のマウスで寛解し、当該マウスにおいて CT-26 細胞の再接種動物は移植細胞を拒絶した。しかし、残りの 3 匹において初発腫瘍細胞

は拒絶されておらず、当該動物に CT-26 細胞を移植した動物では CT-26 細胞の再移植後に該細胞を拒絶することはできなかった。一方 CDDP+HVJ-E/BLM3 回投与群では 5 匹中 4 匹で拒絶が認められた。以上の結果より、腫瘍免疫が惹起されていることが確認された (図 3)。当該腫瘍免疫が CT-26 細胞特異的であるかについて

5 は次試験により判定した。

試験 2-3 でした試験においては CDDP+HVJ-E/BLM3 回投与により寛解したマウスに移植した Meth-A 細胞を拒絶することはできなかった (図 4)。

### 試験 3 の結果

- 10 今までにした試験において当該 CDDP+HVJ-E/BLM において抗腫瘍効果が認められた。しかし、この際の BLM の効果について、HVJ-E の有無、すなわち BLM の HVJ-E へ封入の効果 (HVJ のアジュバント効果も含めて) の検討をしておらず、今回 CDDP 併用時における当該効果について検討した。その結果を図 5 に示した。図から明らかなように、BLM を HVJ-E に未封入の場合においてした試験では当該処理
- 15 において腫瘍の退縮効果は BLM を HVJ-E に封入した場合に比べて全く上がらず、腫瘍を退縮させることはできなかった。CDDP 併用時において BLM を腫瘍組織直接導入する際にも、BLM を HVJ-E に封入し腫瘍組織に導入しなければ腫瘍を退縮させる効果が認められないことが判明した。

### 20 試験 4 の結果

試験 1 および 2 においてした試験結果において、CDDP の全身投与と BLM を HVJ-E に封入し腫瘍組織に直接投与することにより、以下の点が明らかになった。

- ・腫瘍組織を退縮させることができること
- ・その効果は BLM を HVJ-E に封入した試料を複数回投与して効果があがること
- 25 ・当該処理において移植細胞を退縮した寛解したマウスに同細胞を再移植した動物では当該細胞を拒絶したこと
- ・しかし、当該寛解マウスに同系異種細胞を移植した場合には拒絶することがで

きなかったこと

よって当該試験において移植細胞に特異的な免疫が誘導されることが推定されたが、さらに直接的な特異的免疫の誘導を調べるため CT-26 細胞に特異的な免疫  
5 が誘導されているかどうかについて検討した。

(1)CT-26 細胞未接種群、(2)CT-26 細胞のみ接種群、(3)CT-26 細胞接種+CDDP  
投与群、(4) CT-26 細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3 回投与群を設定、CTL assay を行  
い CT-26 細胞に特異的な CTL について検討した。エフェクター細胞(E)とターゲッ  
ト細胞(T)との比、E/T 比を変化させ、% specific Cr release により CTL の誘  
10 導を調べた。結果図 6 より ET 比を 80%としたとき、(1)CT-26 細胞未接種群: 8.1%、  
(2)CT-26 細胞のみ接種群: 8.1%、(3)CT-26 細胞接種+CDDP 投与群: 12.9%、(4)  
CT-26 細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3 回投与群: 33.5%となった。

以上の結果より (4) CT-26 細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3 回投与において CT-26  
細胞に特異的な CTL の誘導が起こっていることが判明した。

15

#### 試験 5 の結果

(1)対照群、(2)HVJ-E 群、(3)BLM のみ群、(4)HVJ-E/BLM 群、(5)CDDP のみ群、(6)  
CDDP+HVJ-E/BLM 単回投与群、(7)CDDP、HVJ-E/BLM3 回投与群を設定し、CDDP 投与  
9 日後の当該動物より腫瘍組織を採取し、当該組織の切片をそれぞれ作製した。  
20 まず、HE 染色(図 7, 8)および抗 CD-4 抗体および抗 CD-8 抗体特異的免疫組織染色  
(データは示さず)より当該組織において認められる特徴的な病理所見を記載する。

(1)対照群においては核分裂を呈している細胞が多く、また核密度が高いという  
腫瘍細胞に特異的な悪性細胞所見が認められた。腫瘍組織の中心部ではネクロ  
ティックな細胞死が認められた。大半が sarcoma 細胞特有の形態、つまり CT-26  
25 細胞の旺盛な増殖像が認められた。CD-4 および CD-8(図 9, 10)陽性像はほとんど  
見られなかった。(2)HVJ-E 群においても総体的に (1)対照群とほぼ同じであり、  
HVJ-E を投与した針跡近傍で好中球の浸潤が認められた。(3)BLM のみ群、(4)HV

J-E/BLM 群においても、ほぼ同様の所見であった。

- 前者に比べて(5)CDDPのみ群では、腫瘍組織の広範にわたって腫瘍細胞の壊死像が認められた。これは腹腔内投与したCDDPが血管等を通じて腫瘍組織に広がり、
- 5 CDDPの抗癌剤としての効果により腫瘍細胞を排除していると考えられた。しかし、CDDPのみの投与ではまだ腫瘍細胞を壊滅させることはできず、腫瘍細胞の残存が認められ、当該細胞によりCDDP投与9日後の腫瘍増殖が認められたものと推察された。(6)CDDP HVJ-E/BLM単回投与群では、総体的に腫瘍細胞が少なくなり、かなりの腫瘍細胞は消滅している。本試料の回収日はCDDP投与9日目であり、まだ
- 10 寛解状態に至っておらず、本試料が寛解できうるかどうかは不明である。ただ、CD-4およびCD-8陽性細胞数(図9,10)は増加しているが、後述のHVJ-E/BLMの連続投与に比べると少ない。(3)CDDP HVJ-E/BLM3回投与群では、腫瘍細胞はほとんど/全く認められず、抗原線維が変性壊死を起こし液状状態の部位が認められた。総体的に細胞数が少なく、広範に好中球の浸潤が認められた。特徴的なことは、
- 15 他組織ではそれほど認められることのなかった、抗CD-4抗体および抗CD-8抗体陽性細胞(図9,10)が広範に認められたことが特徴として挙げられる。腫瘍組織に浸潤する抗CD-8抗体に対する陽性細胞のほとんどはCTL細胞であることが報告されており、(3)CDDP HVJ-E/BLM3回投与群で、腫瘍の寛解は試験4の結果と合わせてCTLによるものであると予想された。

20

本実施例では(1)樹状細胞によるワクチン効果がCpG-ODNを添加することにより上昇した点、と(2)HVJ-E/BLMの腫瘍内投与とCDDPの全身投与の相乗効果により抗腫瘍免疫が惹起されたことが示された。

また本発明の特徴として、以下を挙げることができる。

- 25 ・腫瘍の寛解が認められた。

・寛解の理由の一つとして、CD-8陽性細胞の腫瘍組織への浸潤、つまり腫瘍細胞特異的なCTLによる効果が考えられる。

・HVJ-E/BLM あるいは CDDP 単独投与のみでは効率のよい腫瘍免疫が惹起できないことから併用が重要である。

・CDDP 投与で CDDP の効果は弱いながらも腫瘍組織全体に行き渡り、その後の HVJ-E/BLM 投与により、CDDP により脆弱となった腫瘍組織に HVJ-E/BLM が効率よく 5 送達されその効果を発揮した。

・その際、HVJ-E は腫瘍免疫を惹起するアジュバントとして作用する。

#### 免疫染色図の説明

##### 図 7 および 8 の HE 染色図に対する説明

- 10 Control では CT-26 癌細胞の、核密度が高い、hyper chromatin、核の大きさの不揃い、核分裂が多い等の悪性所見像が認められる。この現象は HVJ-E、BLM、HVJ-E/BLM 投与時にも多少の差はあれ同様の所見が認められた。壊死部分での好中球、マクロファージの浸潤像が認められた。CDDP 投与の試料では空胞変性が認められ好中球、マクロファージ等が癌細胞中に浸潤しており、係る細胞が癌細胞を 15 取り囲んでいる様子が見受けられる。CDDP+HVJ-E/BLM の単回投与では、腫瘍細胞数が少なくなり、リンパ系細胞が多く認められる。HE 染色の濃さが薄くなり、よりピンクな像となっている。これは細胞中の核酸濃度が低下している証拠であり、癌細胞の細胞密度が低下していることによるものであると考えられる。CDDP+HVJ-E/BLM の 3 回投与では、ほとんど癌細胞が認められず、あっても分裂像は少なく 20 増殖性を失っている。変性壊死している部分が多く炎症性細胞の浸潤も広範囲に認められ、リンパ球系細胞も多く認められた。

#### (実施例 2)

##### (1) 試験デザイン

#### 25 MB49 細胞接種マウスモデル

本実験モデルは、例えば Anticancer Res., 2004, 24(4):2225-30. などに記載された方法に従って作成することができる。

具体的には、 $2 \times 10^6$  個の MB49 細胞を B6 マウスの背部皮内に接種し、5 日間放置し腫瘍径が 7-8mm になった動物の腫瘍内に、G1~G6 各群それぞれのサンプルを 3 回接種し効果を検討した。

G1; 生理食塩水(コントロール)

5 G2; アドリアマイシン(ADM)  $20 \mu\text{g}$

G3; ADM  $100 \mu\text{g}$

G4; ADM  $20 \mu\text{g}$ +HVJ-E 5000HAU

G5; ADM  $100 \mu\text{g}$ +HVJ-E 5000HAU

G6; HVJ-E 5000HAU

10

## (2) 結果

以下に、各群の腫瘍容量( $\text{mm}^3$ )の経時変化を示す。(図 11 参照)

群	G1	G2	G3	G4	G5	G6
15						
Day 0	120	128.4	119	125.3	117.6	120.5
5	351.1	303.2	285.8	266.6	199.1	423.6
7	442.5	330	291.2	190.6	152.6	734.1
9	717.6	324.9	333.9	267.5	151.6	904.8
20						
12	1188.79	331.74	426.88	333.01	217.84	1510.1
15	2040.38	443.36	450.76	450.76	391.22	2223.65
19	2851.36	773.88	989.52	737.22	287.96	4587.2
21	3876.85	1022.48	1220.44	976.75	490.76	3279.72

25 本実施例では、細胞増殖度が非常に高い MB49 細胞を皮内投与し、しかも腫瘍径が 7-8mm というかなり大きな腫瘍において消失(eradication)が起こるかどうか注目点であった。

結果として、ADM 単独でも腫瘍抑制効果が認められたが、消失は認められなかった。

一方、ADM 100  $\mu$ g+HVJ-E 5000HAU 投与群の 3 匹の動物のうち 1 匹については、腫瘍の消失が認められた。

- 5 これより、HVJ-E と ADM による MB49 細胞に対する抗腫瘍効果を示す結果が得られた。

### (実施例 3)

MB49(移行上皮癌)細胞のアドリアマイシン(ADM)感受性

#### 10 (方法)

アドリアマイシン(ADM)濃度依存的な MB49 の細胞生存率を、以下の方法により WST-8 assay(cell counting kit-8; 同仁化学研究所)を用いて調べた。

MB49 細胞 1 万個にアドリアマイシン(商品名 ; アドリアシン注、協和発酵工業株式会社)を加え、試料溶液量を 200  $\mu$ l とし、96well plate に播種した。

- 15 48 時間培養後に WST-8 assay により上清を除去し、RPMI 培地で 10 倍に希釈した cell counting kit 溶液を 100  $\mu$ l 添加し、1.5 時間 37℃で静置した。マイクロプレートリーダーを用い、450nm の吸光度を測定した。MB49 細胞のみで生育させた試料の吸光度を 100%の生存率とし、各濃度における生存率を算出した。生存率が 50%、90%となる濃度を算定し、LD<sub>50</sub>および LD<sub>90</sub>とした。

20

#### (結果)

---

ADM( $\mu$ g/ml)	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	1
2										
25 生存率(%)	68.9	60.1	54	48	47.4	34.9	27.6	22.6	17.2	11.7
6.7										

---

MB49 細胞に対する ADM の  $LD_{50}$  濃度は  $0.008 \mu\text{g/ml}$  および  $LD_{90}$  濃度は  $1 \mu\text{g/ml}$  となった(図 12 参照)。

この結果より、膀胱内への MB49 細胞、HVJ-E、ADM の同時投与においては、MB49 細胞の ADM に対する感受性は、*in vitro* の系で反映できることが示された。

5

(実施例 4)

膀胱内への MB49 細胞、HVJ-E、ADM の同時投与による抗腫瘍効果

(方法)

各群 3 匹の C57BL/6Cr Slc 6 週齢 ♀マウスに、ケタミン(50mg)  $90 \mu\text{l}$  + キシラ  
10 ジン(2%溶液)  $10 \mu\text{l}$  を混合したものを左大腿筋に投与麻醉し、膀胱に 24G カテーテルを挿入し、以下の試料溶液  $100 \mu\text{l}$  を  $1\text{ml}$  シリンジで投与して 1 時間カテーテルを留置した。

設定した群は次の通りである。

- 1 MB49 + ADM( $0.008 \mu\text{g/ml}$ )
- 15 2 MB49 + ADM( $0.008 \mu\text{g/ml}$ ) + HVJ-E(5000HAU)
- 3 MB49 + ADM( $1 \mu\text{g/ml}$ )
- 4 MB49 + ADM( $1 \mu\text{g/ml}$ ) + HVJ-E(5000HAU)

投与した MB49 細胞数は  $5 \times 10^6 \text{cell}$  とした。最終容量は  $100 \mu\text{l}$  となるように調整し、膀胱内へ投与した。2 週間後に膀胱を摘出し、切片を作製、HE 染色を行っ  
20 た。

(結果)

HE 染色像より、腫瘍の浸潤を評価した。第 1 群および第 2 群では、全ての動物において MB49 細胞の浸潤像が認められた(図 13, 15 参照)。図 13 において、中央  
25 の紫色(黒色)の濃い部分が癌細胞である。ADM の濃度を上げ、 $LD_{90}$  に相当量を投与第 3 群においても、80%の動物では MB49 細胞の浸潤を阻止することはできなかった。しかし、第 4 群に 5000HAU の HVJ-E を添加した群においては、MB49 細胞の浸



潤した動物は全く認められなかった(0/5、浸潤阻止率 100%) (図 14, 15 参照)。

これより、ADM 単独では MB49 細胞の膀胱内浸潤を阻止できないが、ADM と HVJ-E を併用することにより浸潤を阻止できることが示された。

特に ADM(1 $\mu$ g/ml)に HVJ-E を加えた群は、ADM のみを加えた群に比べて MB49 の  
5 膀胱への生着率(癌の発生率)が顕著に抑制された。

#### (実施例 5)

シスプラチン (CDDP) と HVJ-E の併用による抗腫瘍効果

#### (方法)

- 10 BALB/c マウスの背部皮内に CT-26 マウス大腸癌細胞を  $5 \times 10^6$  cells/head で接種した。接種から 5 日後に、HVJ-E および CDDP のよる処置を以下の動物群において開始した。それぞれの動物群の腫瘍容量は長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径/2 で算出した。

動物群：

- 15 #1: 生食群  
#2: HVJ-E 単独  
#3: CDDP 1mg/kg  
#4: CDDP 3mg/kg  
#5: CDDP 1mg/kg+HVJ-E (5,000HAU)  
20 #6: CDDP 3mg/kg+HVJ-E (5,000HAU)

(各群 n=5 ないし 6)

#### (結果)

- 卵および細胞由来の HVJ-E を用いて試験を行った各群の腫瘍容積の平均値を図  
25 1 6 (卵由来)および図 1.7 (細胞由来)に示した。腫瘍容積について、生食群、HVJ-E 単独投与群、CDDP の 1mg/kg 投与群の 3 群においては、容積において大きな差は認められなかった (図 1 6 (卵由来))。細胞由来 HVJ-E 投与群では、生食群、

HVJ-E 単独投与群、CDDP の 1mg/kg 投与群の順に退縮効果が認められた。

今回注目した腫瘍の退縮効果については、CDDP 1mg/kg+HVJ-E 5,000HAU および CDDP 3mg/kg+HVJ-E 5,000HAU 投与群の 33-40%の動物に認められた（卵および細胞由来 HVJ-E の両者において）。よって、HVJ-E に抗癌剤を封入することなく、  
5 HVJ-E と混和するだけで抗腫瘍効果を呈することが確認できた。

（実施例 5）

HVJ-E および HVJ のマウス樹状（DC）細胞に対する応答

（方法）

10 マウスからの樹状細胞（DC）の回収

マウスの両下肢の大腿骨および脛骨を採取した。骨に付随する筋肉および脂肪を極力取り除いた。骨の両端を切離した。27G 針付着シリンジを用いて、開口部より無血清培地（RPMI1640、抗生物質含有）を流入させ、圧力により骨髓を流出させた。当該処置により回収した骨髓細胞を含む試料溶液を、40 $\mu$ m 径のセルス

15 トレイナー（BD Falcon 社）に通し、残渣を除去した。1,500rpm、5 分間遠心分離を行い、細胞を回収した。DC 培地（RPMI1640、10%FCS（MBL, EQITECH 社）、10ng/500ml の GM-CSF（R&D system 社）、2 $\mu$ l/500ml の 2-メルカプトエタノール（以下 DC 培地）に、当該細胞を懸濁した。該細胞総数をカウントし、DC 培地 1ml に細胞数が 1 $\times 10^6$  cells/ml となるように、添加培地量を調整し、24well plate に各 well、1ml  
20 となるように細胞を撒いた。2 および 4 日後に上清を交換した。6 日後に浮遊細胞を回収した。

DC と HVJ または HVJ-E との共培養

DC と生ウイルスである HVJ あるいは不活化した HVJ-E との共培養により誘導さ  
25 れるサイトカイン量を測定した。当該 DC（1 $\times 10^6$  cells/ml）に対して、m.o.i. が 20 相当になるように、HVJ あるいは HVJ-E を培養液中に添加した。NF- $\kappa$ B の阻害剤である N-トシル-L-フェニルアラニクロロメチルケトン（TPCK, 15 $\mu$ M,

和光純薬)の有無についても検討した。さらに、典型的な Th1 免疫誘導物質である、大腸菌の細胞壁(lipopolysaccharide, LPS, 10 $\mu$ M)についても検討した。2 日間培養を行い、上清を回収した。当該溶液中の IL-12、IL-6、IL-5 および IL-4 のサイトカイン濃度を R&D system 社の ELISA Development kit を用いて測定した。

さらに、DC の maturation についても検討した。

#### (結果)

結果を図 18 に示した。HVJ と HVJ-E との比較において、IL-12 は HVJ 刺激においては 4928pg/ml であるのに対して、HVJ-E では 748 pg/ml であり、誘導量がかなり低減されていた。一方 IL-6 は HVJ 刺激においては 1066pg/ml であるのに対して、HVJ-E では 496 pg/ml であった。一方 IL-4 および IL-5 の誘導はほとんど認められなかった。(図 18)

HVJ-E および HVJ で刺激することにより、LPS で刺激したのと遜色ない程度に DC の maturation が認められた。

#### (実施例 6)

HVE-J の制御性 T 細胞 (reg T) に対する影響

#### (方法)

CT-26 (1 $\times 10^5$  細胞)を 96well plate に 200 $\mu$ l の容量 (DMEM、10%FCS 含有)で撒いた。翌日に樹状細胞 (1 $\times 10^5$  細胞)を加えた。培地は DC 培地 200 $\mu$ l に交換した。その際に HVJ-E の有無 (10<sup>4</sup>–10<sup>9</sup>/well)、さらに CDDP (1 $\mu$ g/ml あるいは 3 $\mu$ g/ml)もそれぞれ添加した。翌日に BALB/c マウスより回収した 5 $\times 10^5$  個の脾臓細胞を加えた。3 日間培養を行った。細胞を回収し、T 細胞および制御性 T 細胞 (reg T)について BrdU の取り込み率を FACS により解析した。

#### (結果)

HVJ-E、HVJ-E+CDDP (1 $\mu$ g/ml) および HVJ-E+CDDP (3 $\mu$ g/ml) を作用させることにより、T 細胞全体の細胞増殖には影響を与えなかったが、制御性 T 細胞 (reg T) については細胞の増殖を HVJ-E 濃度依存的に抑制した。(図 19 および 20)

5

#### 産業上の利用可能性

- 本発明の実施により、わが国で急速に増加しつつある肺癌、乳癌、胃癌・大腸癌・食道癌などの消化器癌、頭頸部癌(上顎癌, 舌癌, 口唇癌, 咽頭癌, 喉頭癌, 口腔癌など)、婦人科領域の癌(子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌など)、泌尿器科領域の癌(前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、副腎腫瘍、陰茎癌など)、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌等すべての固形癌への新たな化学療法が、HVJ-E ベクターを用いることにより可能になる。すなわち、本発明により抗腫瘍免疫を惹起するウイルスベクターに化学療法剤を封入した医薬組成物が提供され、それにより生体内の抗腫瘍免疫を高め、かつ正常細胞への副作用を抑えながら、種々の癌を治療することができる。
- 15 また、本発明の別の態様である HVE-J および抗癌剤を含有する医薬組成物により、特に泌尿器科領域の癌を効率よく治療することができる。

本出願は、日本で出願された特願 2004-108599、特願 2004-136756 および特願 2005-044639 を基礎としており、それらの内容

20 は本明細書に全て包含されるものである。

## 請求の範囲

1. ウイルスエンベロープからなる免疫アジュバント。
- 5 2. 前記アジュバントが免疫応答を増強させるためのアジュバントである、請求項1記載のアジュバント。
3. 前記アジュバントが抗腫瘍免疫を増強させるためのアジュバントである、請求項1または2記載のアジュバント。
- 10 4. 前記ウイルスが、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属する
- 15 ウイルスである、請求項1ないし3記載のアジュバント。
5. 前記ウイルスがセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルスまたはインフルエンザウイルスから選ばれた1種である、請求項1ないし4記載の
- 20 アジュバント。
6. 前記ウイルスがセンダイウイルスである、請求項1ないし5記載のアジュバント。
- 25 7. 免疫アジュバントとして使用するためのウイルスエンベロープ。
8. 免疫アジュバントとして使用するためのセンダイウイルスエンベロープ。

9. 抗腫瘍免疫アジュバントとして使用するためのセンダイウイルスエンベロープ。

10. 抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球（CTL）細胞の腫瘍組織へ集積させるための、ウイルスエンベロープとシスプラチンの使用。

11. 抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球細胞の腫瘍組織へ集積させるための、ウイルスエンベロープ、シスプラチンおよび化学療法剤の使用。

12. 前記ウイルスエンベロープがセンダイウイルスエンベロープ(HVJ-E)である、請求項10または11記載の使用。

13. 前記化学療法剤がブレオマイシンである、請求項10ないし12記載の使用。

14. ウイルスエンベロープとシスプラチンを用いた、抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球細胞の腫瘍組織へ集積させる方法。

15. ウイルスエンベロープおよびシスプラチンを含有してなる、抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球細胞の腫瘍組織へ集積させるための医薬組成物。

25

16. 抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として細胞傷害性Tリンパ球細胞の腫瘍組織へ集積させるための医薬を製造するための、ウイルスエンベ

ローブおよびシスプラチンの使用。

17. 免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入した化学療法剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

5

18. 化学療法剤が抗癌剤である、請求項17記載の医薬組成物。

19. 化学療法剤がブレオマイシン類、アントラキノン系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、カンプトテシン類、シスプラチン類、ストレプトゾ

10 トシン、5-フルオロウラシル(5-FU)およびその誘導体、ビラルビシンおよびそれらの薬理的に許容される塩から選ばれた1種以上である、請求項17または18記載の医薬組成物。

20. ブレオマイシン類が、ブレオマイシンまたはその薬理的に許容される塩、  
15 あるいはペプロマイシンまたはその薬理的に許容される塩である、請求項17ないし19記載の医薬組成物。

21. ブレオマイシン類が、塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシンまたは硫酸ペプロマイシンである、請求項17ないし20記載の医薬組成物。

20

22. 免疫惹起能を有するウイルスが、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選  
25 択される科に属するウイルス由来である、請求項17ないし21記載の医薬組成物。

23. 前記ウイルスがセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルスまたはインフルエンザウイルスから選ばれた1種である、請求項17ないし22記載の医薬組成物。

5

24. 化学療法剤が塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシンまたは硫酸ペブロマイシンから選ばれた1種以上であり、ウイルスがセンダイウイルスである、請求項17ないし23記載の医薬組成物。

10 25. 注射剤である請求項17ないし24記載の医薬組成物。

26. 固形癌の治療剤である、請求項17ないし25記載の医薬組成物。

27. 固形癌が、肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科  
15 領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫または原発不明癌から選ばれた1種である、請求項26記載の医薬組成物。

28. 消化器癌が胃癌、大腸癌または食道癌から選ばれた1種である、請求項27記載の医薬組成物。

20

29. 頭頸部癌が上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌または口腔癌から選ばれた1種である、請求項27記載の医薬組成物。

30. 婦人科領域の癌が子宮癌、卵巣癌または子宮頸癌から選ばれた1種である、  
25 請求項27記載の医薬組成物。

31. 泌尿器科領域の癌が前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、



副腎腫瘍または陰茎癌から選ばれた１種である、請求項２７記載の医薬組成物。

３２．免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターを有効成分とし、化学療法剤との併用に供することを特徴とする医薬組成物。

５

３３．免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターおよび化学療法剤を１製剤中に含有することを特徴とする、請求項３２記載の医薬組成物。

３４．生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置するための、センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤を含有する医薬組成物。

１０

３５．生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置するための、センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤と、さらなる抗癌剤を含有する医薬組成物。

１５

３６．センダイウイルスエンベロープがリポソームの形態でないことを特徴とする請求項３４または３５記載の医薬組成物。

３７．抗癌剤がブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、請求項３４ないし３６記載の医薬組成物。

２０

３８．免疫促進剤が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むタンパク質である、請求項３４または３５記載の医薬組成物。

２５

３９．生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置するための、センダイウイルスエンベロープを有効成分とし、抗癌剤または免疫促進剤との併用に供す

ることを特徴とする医薬組成物。

40. 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置するための、センダイウイルスエンベロープを有効成分とし、抗癌剤または免疫促進剤並びにさらなる

5 抗癌剤との併用に供することを特徴とする医薬組成物。

41. センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤を含有する医薬組成物を投与することを含む、生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する方法。

10

42. センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤に加えてさらなる抗癌剤を含有する医薬組成物を投与することを含む、生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する方法。

15 43. センダイウイルスエンベロープがリポソームの形態でないことを特徴とする請求項41または42記載の方法。

44. 抗癌剤がブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペプロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、請求項41ないし43

20 記載の方法。

45. 免疫促進剤が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むタンパク質である、請求項41ないし44記載の方法。

25 46. 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する医薬を製造するための、センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤の使用。

47. 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する医薬を製造するための、センダイウイルスエンベロープに封入した抗癌剤または免疫促進剤とさらなる抗癌剤の使用。

548. 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する薬剤組成物を製造するための、アジュバントとしてのセンダイウイルスエンベロープの使用。

49. 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する医薬を製造するための、アジュバントおよび抗癌剤または免疫促進剤封入送達ベクターとしての、

10 センダイウイルスエンベロープの使用。

50. 生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固形腫瘍を処置する医薬を製造するための、アジュバントおよび抗癌剤または免疫促進剤送達ベクターとしての、センダイウイルスエンベロープの使用。

15

51. 生体内において腫瘍免疫を惹起させるための、センダイウイルスエンベロープと抗癌剤の併用。

52. 固形腫瘍組織内に細胞傷害性Tリンパ球を導入し抗腫瘍効果を惹起するた

20 めの、センダイウイルスエンベロープの使用。

53. 生体内において抗腫瘍免疫を誘導する術前補助療法(ネオアジュバント療法)に用いるための、センダイウイルスエンベロープの使用。

25 54. センダイウイルスエンベロープがリポソームでないことを特徴とする請求項46ないし53記載の使用。

5 5. 抗癌剤がブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペ  
プロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、請求項 4 6、4 7、4  
9、5 0、5 1、5 4 または 5 5 記載の使用。

5 5 6. 免疫促進剤が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むタン  
パク質である、請求項 4 6、4 7、4 9、5 0 または 5 4 記載の使用。

5 7. 泌尿器科領域の癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープおよ  
び抗癌剤を含有してなる医薬組成物。

10

5 8. 泌尿器科領域の癌が前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、  
副腎腫瘍または陰茎癌から選ばれた 1 種である、請求項 5 7 記載の医薬組成物。

5 9. 抗癌剤がアドリアマイシン、ダウノマイシン、アクリルピシン、アムルピ  
15 シン、イダルピシン、エピルピシン、ピラルピシン、ダカルバジンまたはミトキ  
サントロンから選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 5 7 または 5 8 記載の医  
薬組成物。

6 0. 膀胱癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープとアドリアマイ  
20 シンを含有してなる医薬組成物。

6 1. 膀胱癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープとアドリアマイ  
シンを含有してなる膀胱内注入用医薬組成物。

25 6 2. 膀胱癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープとアドリアマイ  
シンの併用。

6 3. センダイウイルスエンベロープおよび抗癌剤を投与することを含む、泌尿器科領域の癌を治療する方法。

6 4. 泌尿器科領域の癌が前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、腎盂・尿管癌、精巣腫瘍、  
5. 副腎腫瘍または陰茎癌から選ばれた1種である、請求項6 3記載の方法。

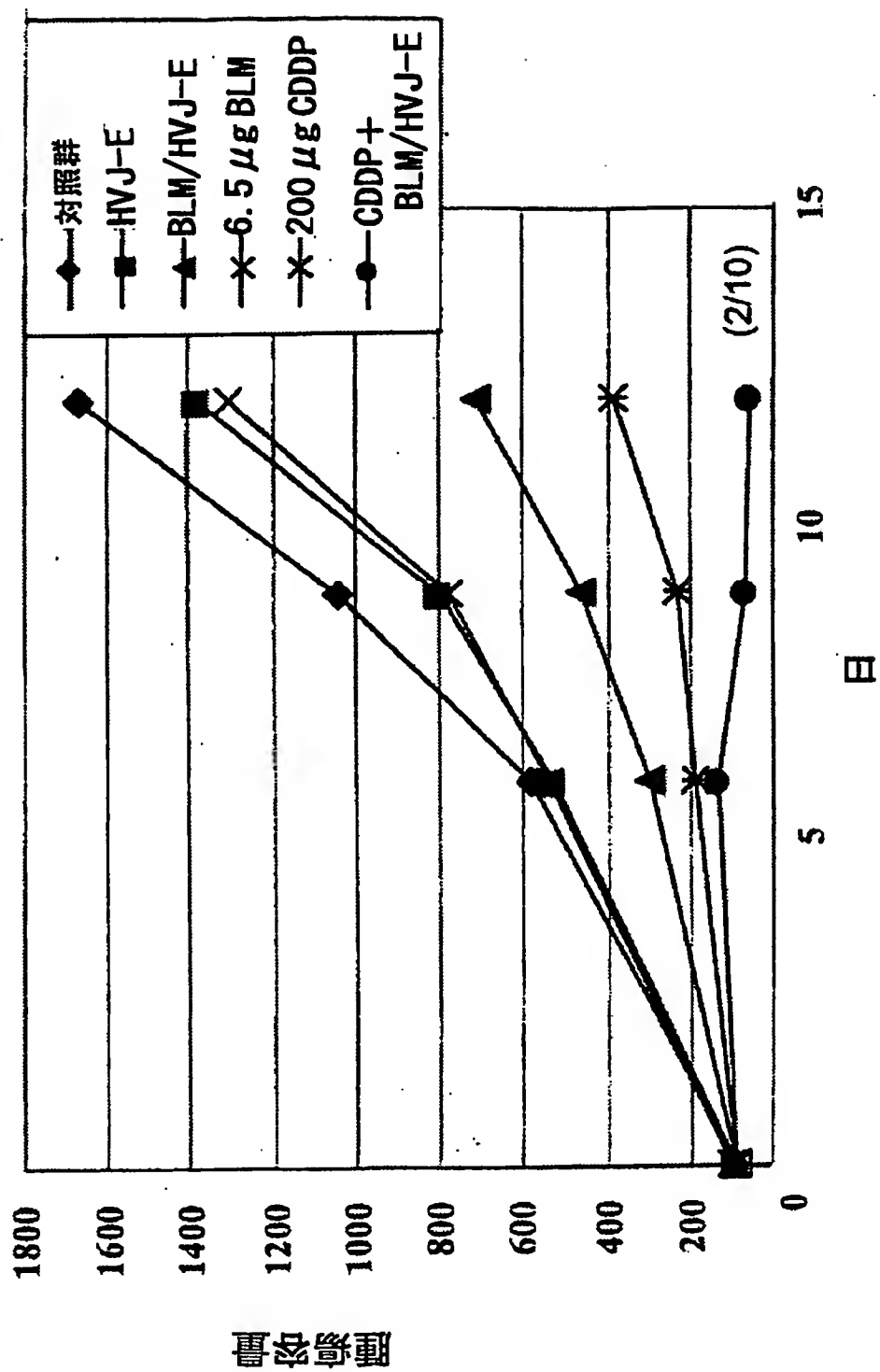
6 5. 抗癌剤がアドリアマイシン、ダウノマイシン、アクリルピシン、アムルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ピラルピシン、ダカルバジンまたはミトキサントロンから選ばれる少なくとも1種である、請求項6 3または6 4記載の方法。  
10 法。

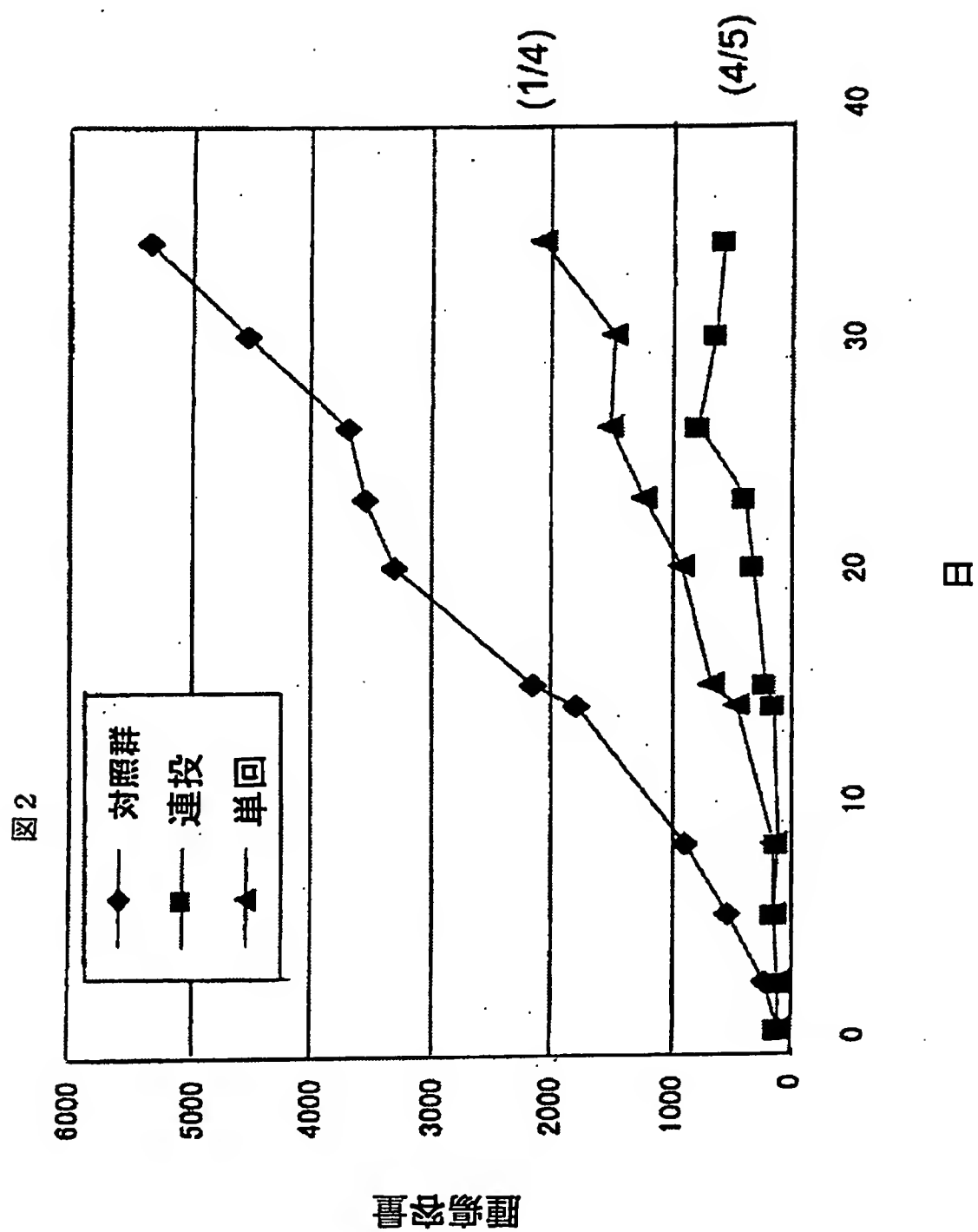
6 6. 膀胱癌を治療するための医薬を製造するための、センダイウイルスエンベロープおよび抗癌剤の使用。

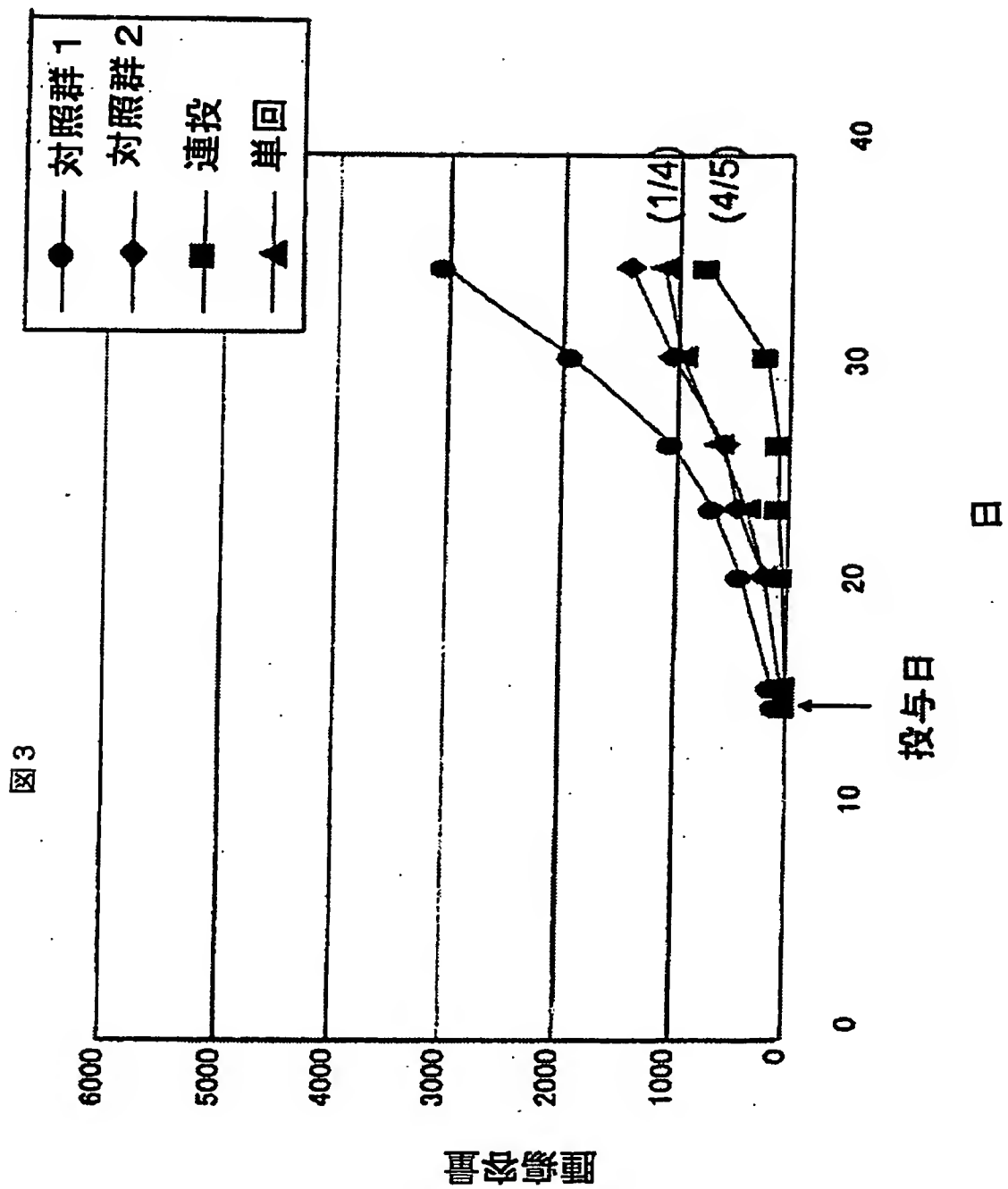
15 6 7. 抗癌剤がアドリアマイシン、ダウノマイシン、アクリルピシン、アムルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ピラルピシン、ダカルバジンまたはミトキサントロンから選ばれる少なくとも1種である、請求項6 6記載の使用。

6 8. 泌尿器科領域の癌を治療するための、センダイウイルスエンベロープを有  
20 効成分とし、抗癌剤との併用に供することを特徴とする医薬組成物。

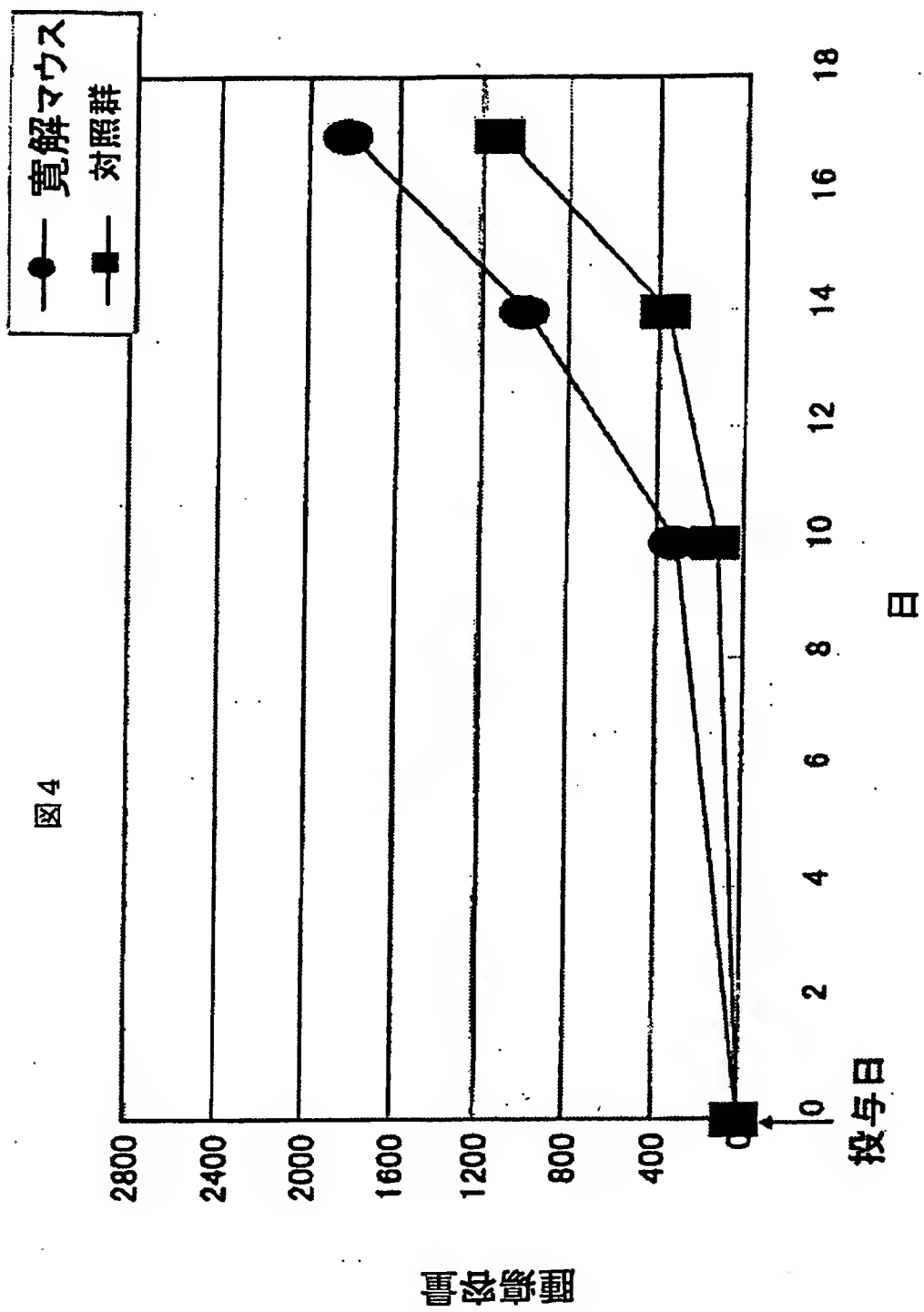
図 1

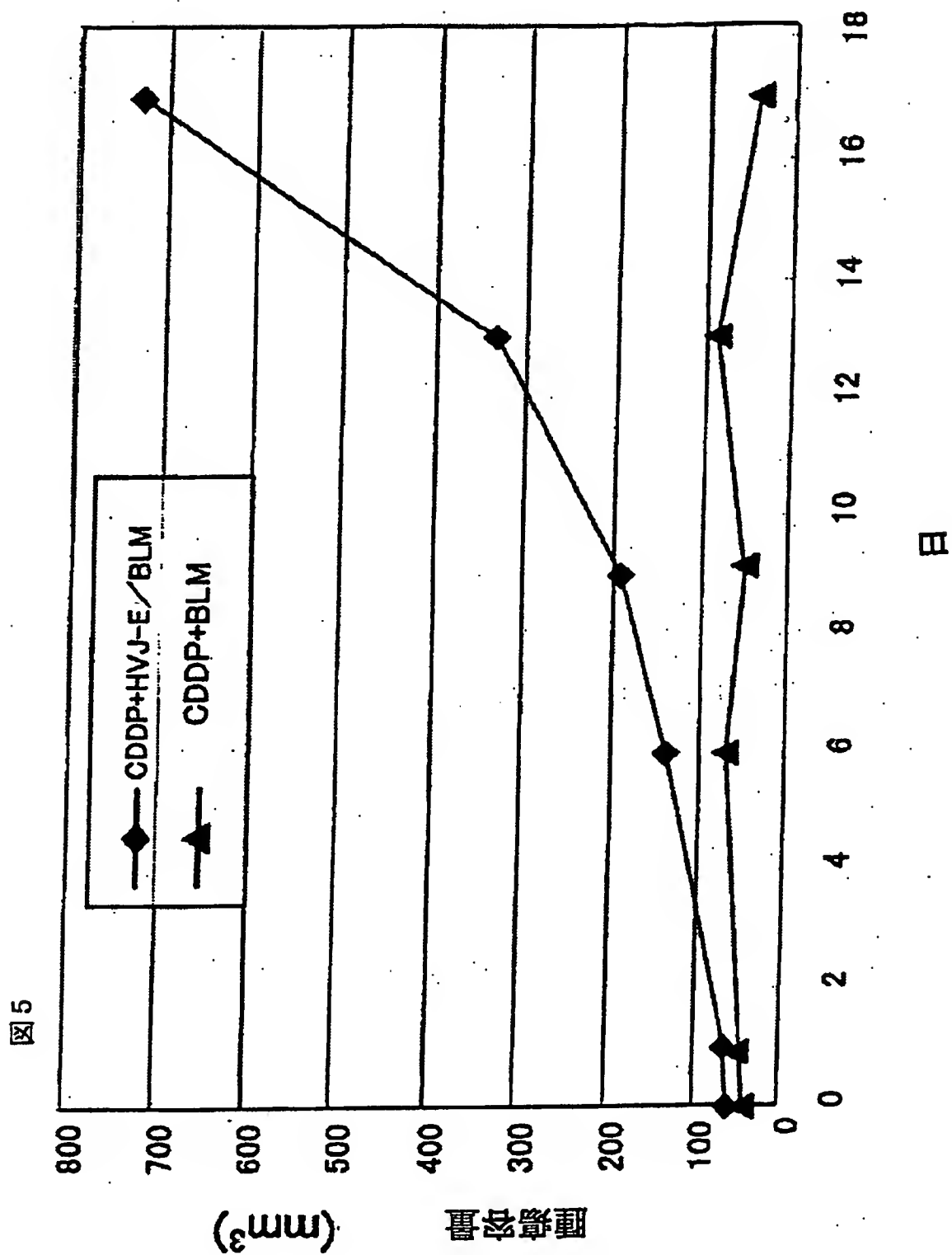












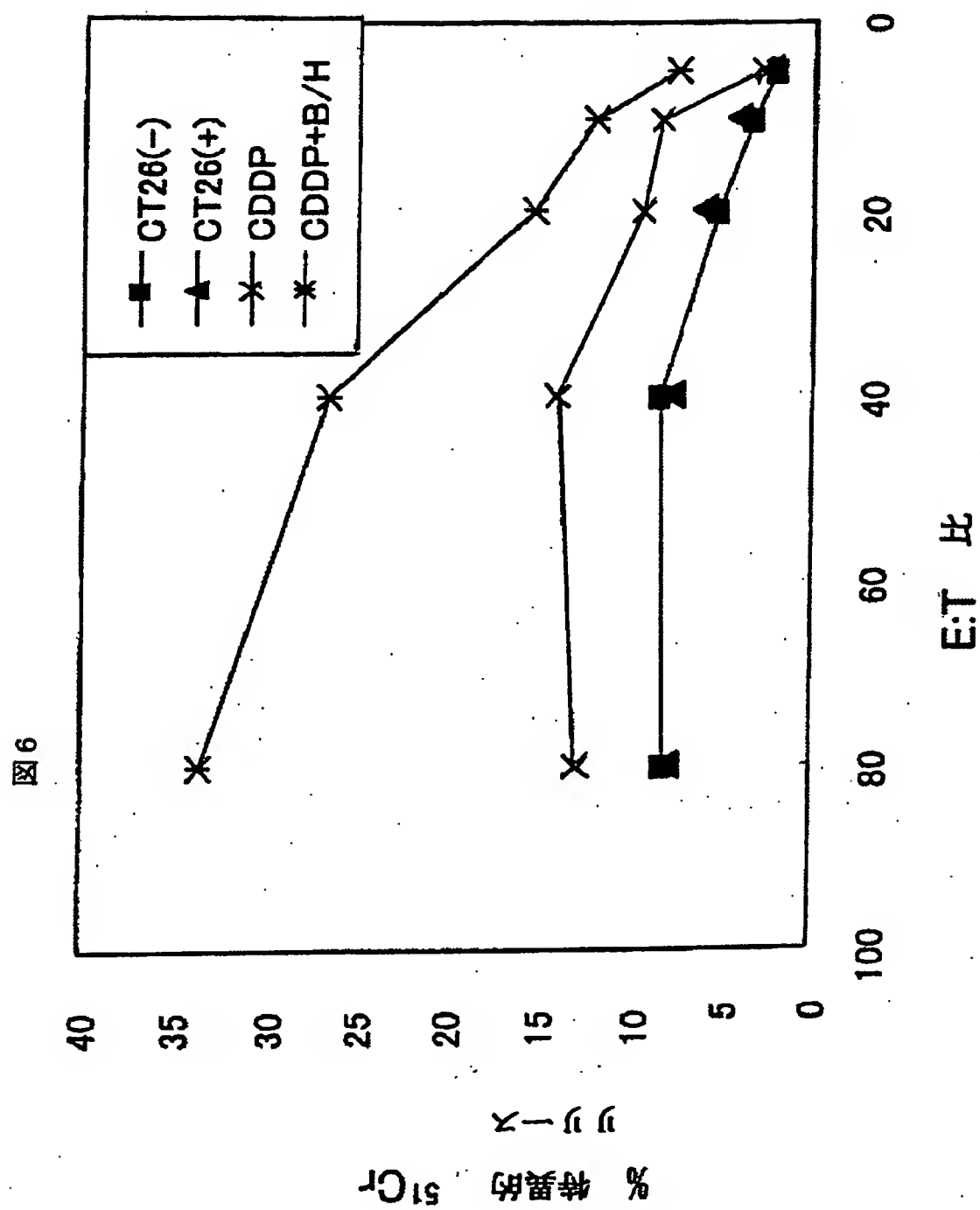


図 7

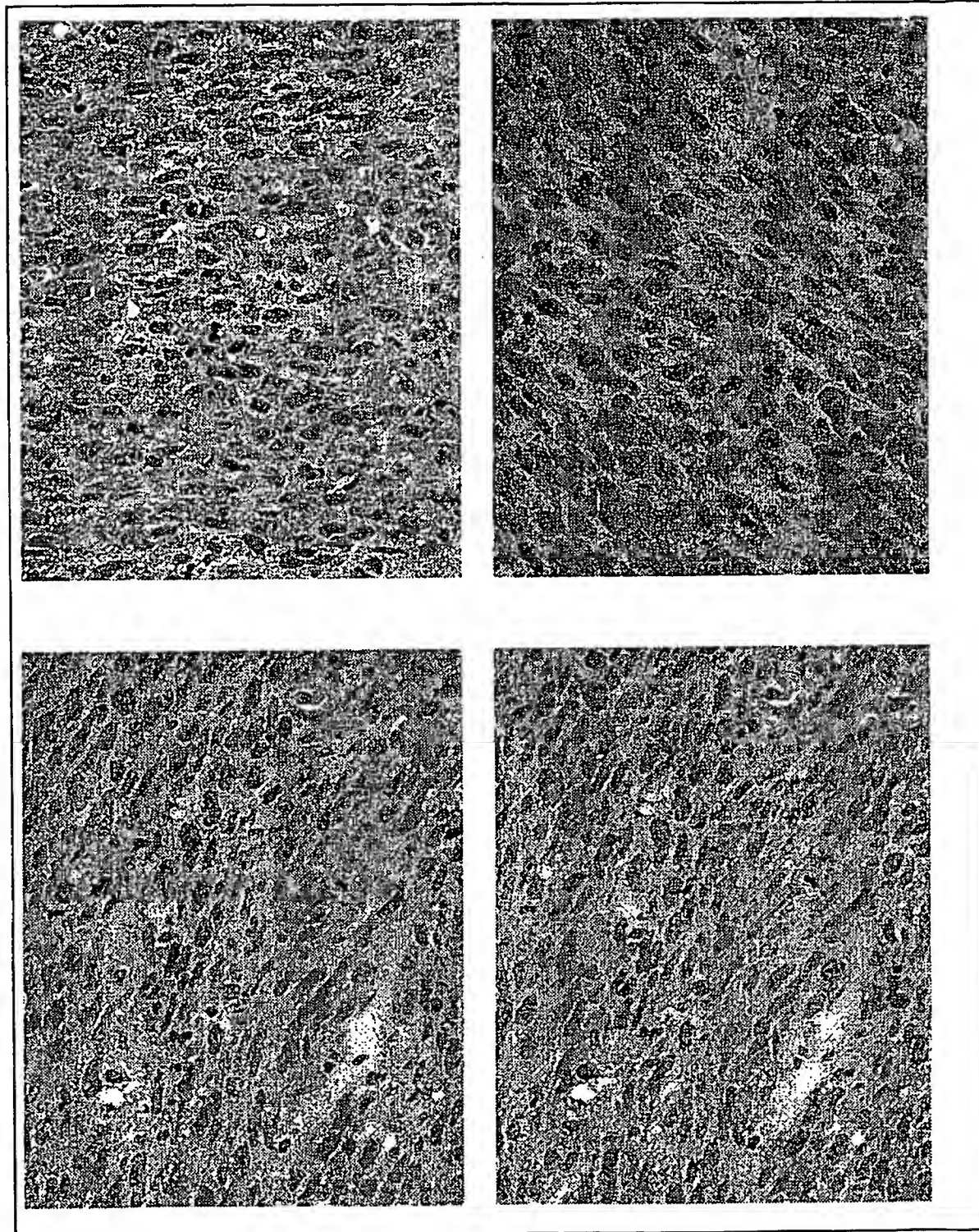


図 8

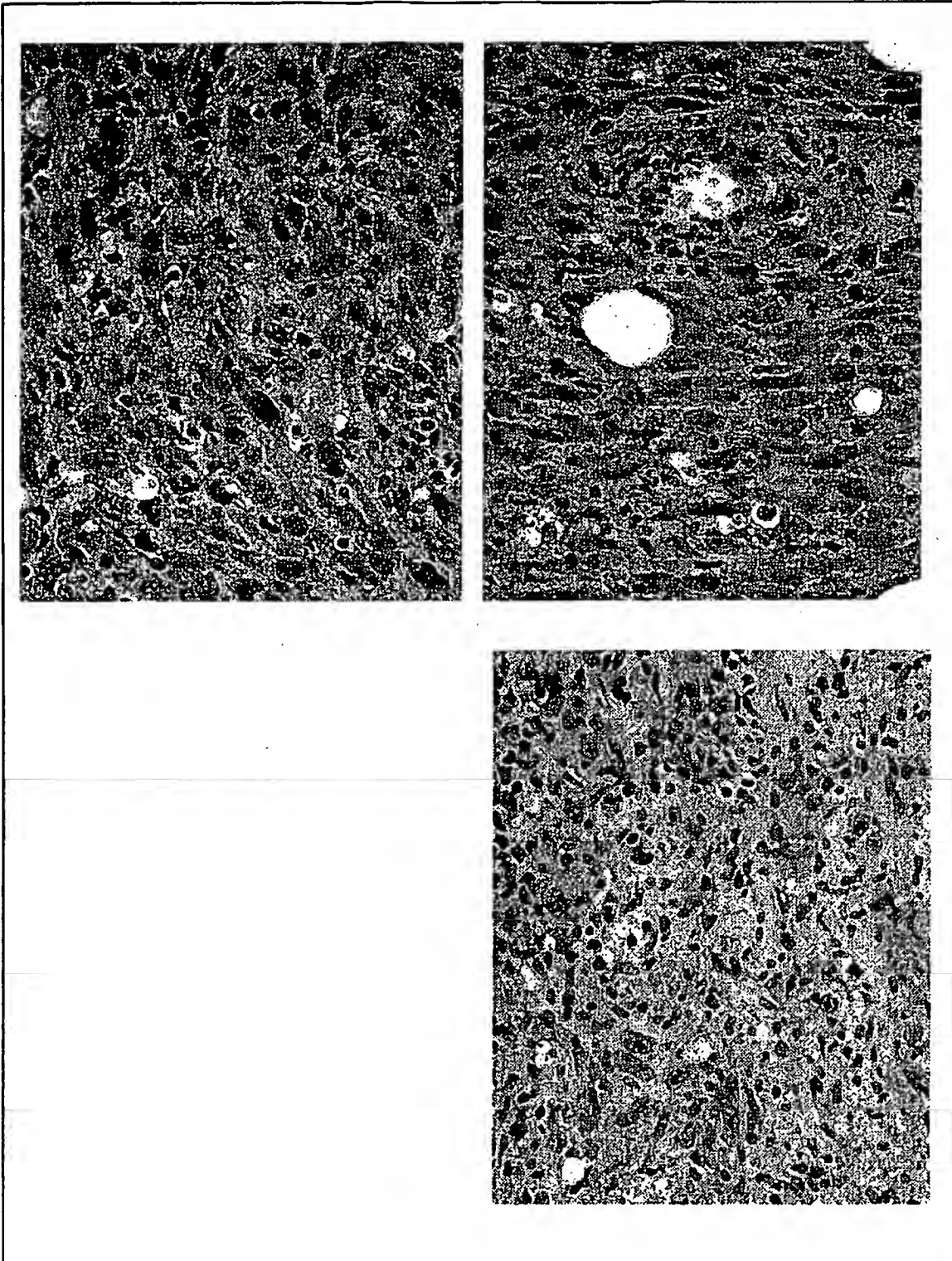
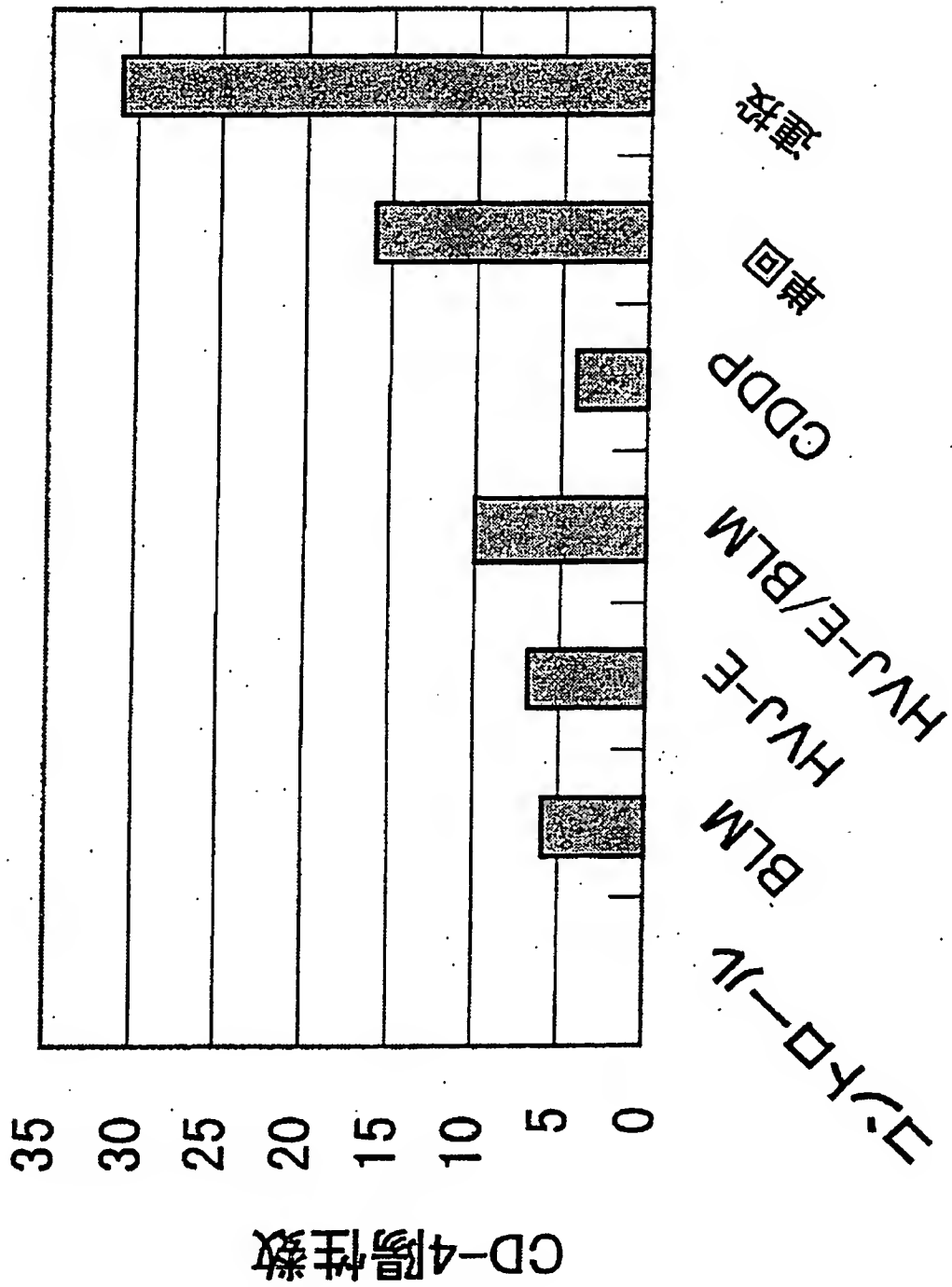


図 9



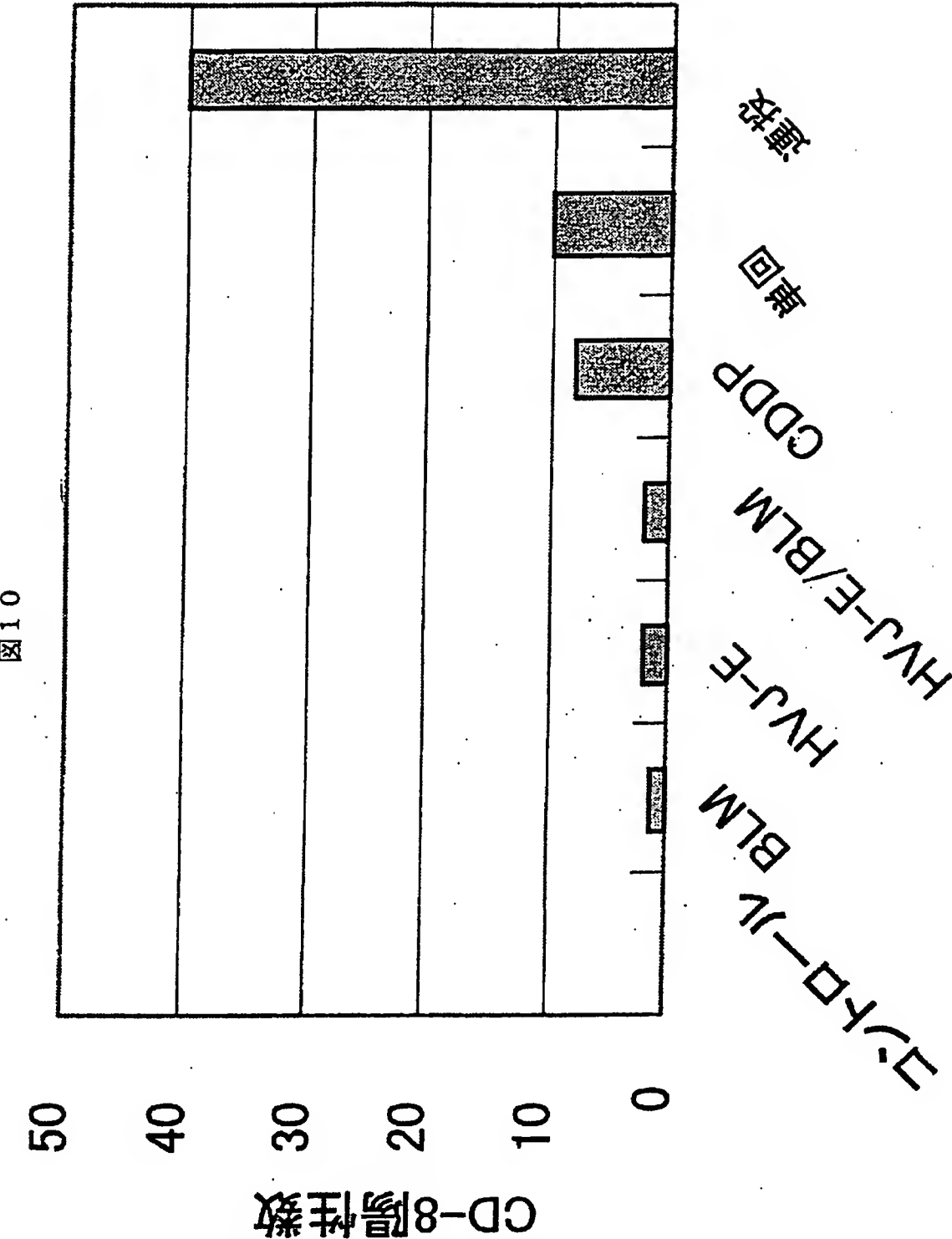


図 1 1

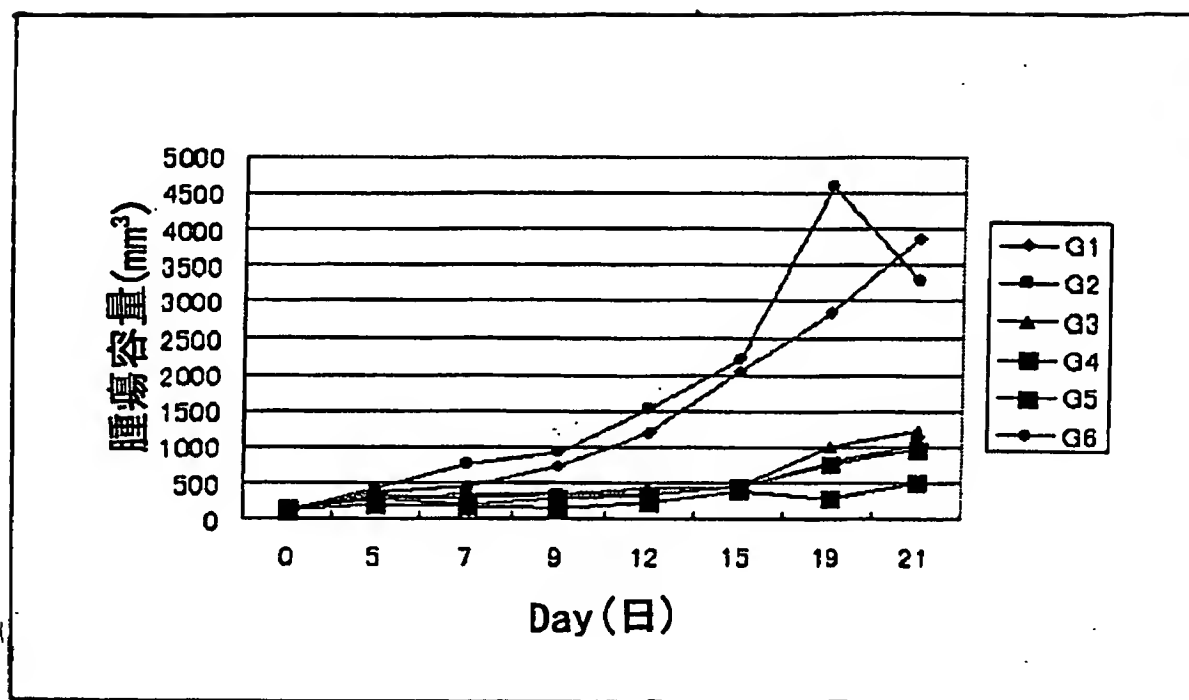




図 12

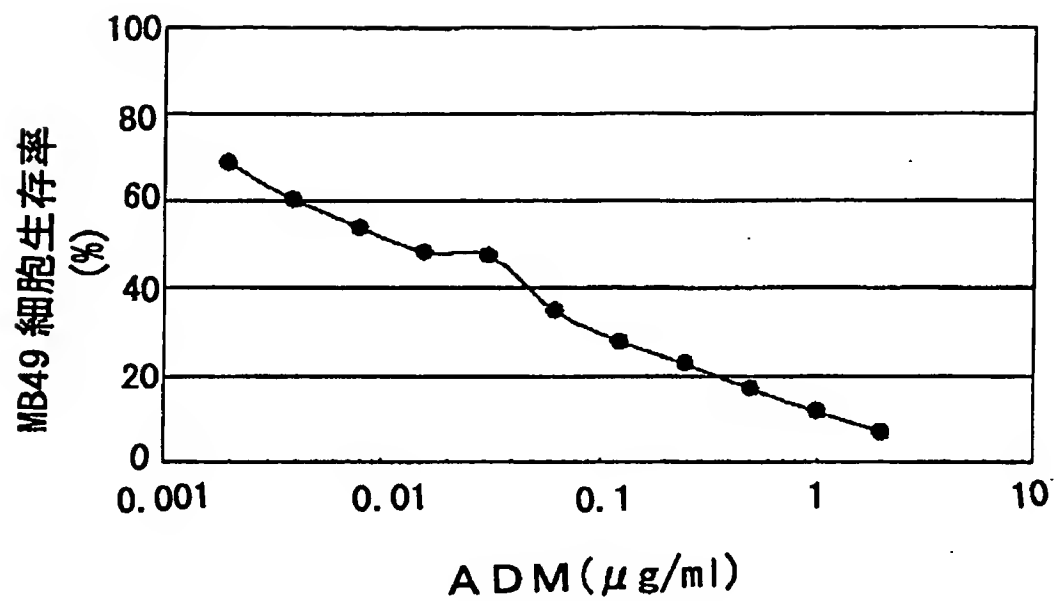


図 1 3

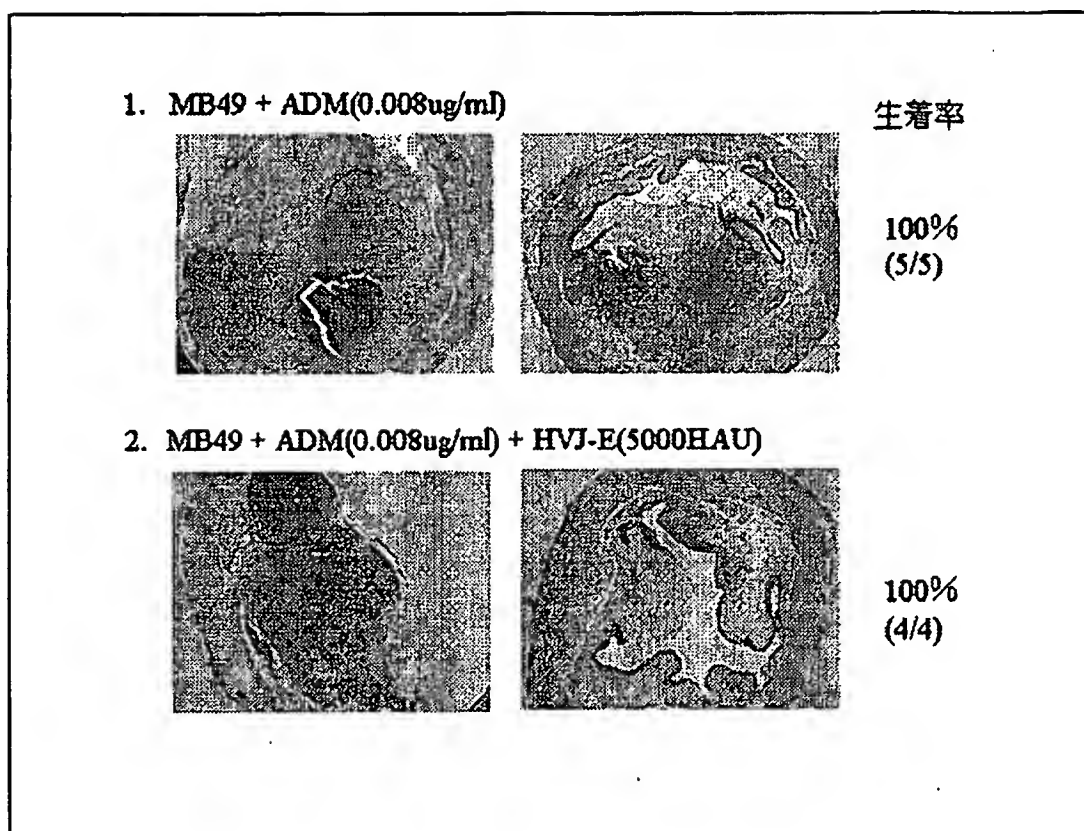


図 1 4

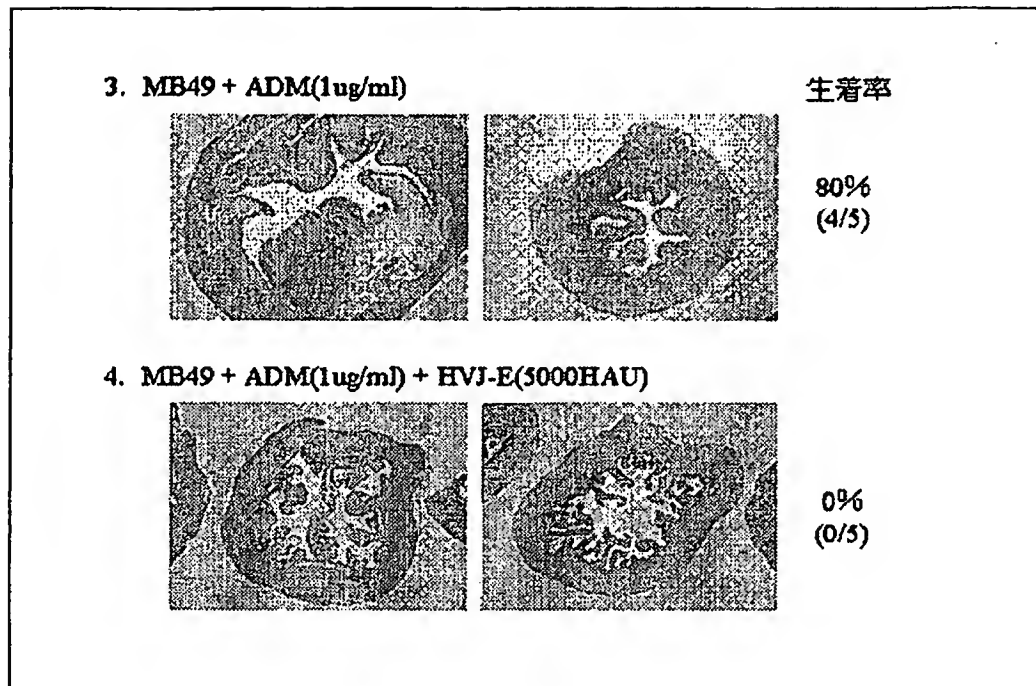


図 1 5 .

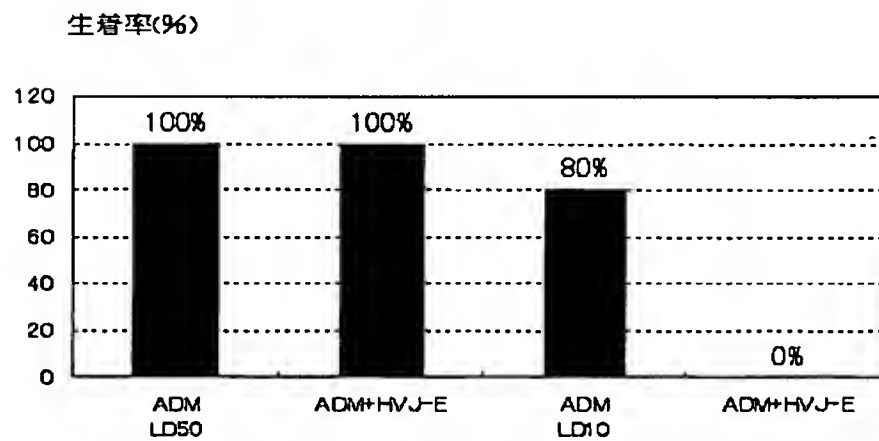


図 1 6

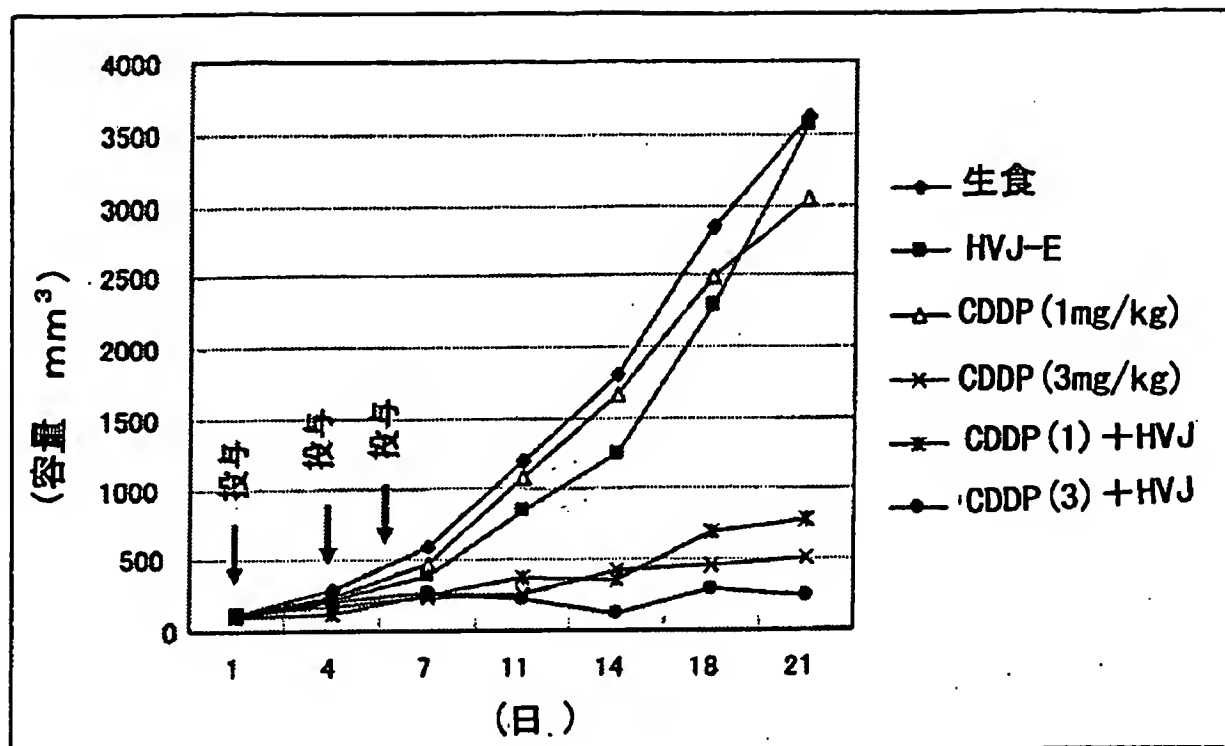


図 1 7

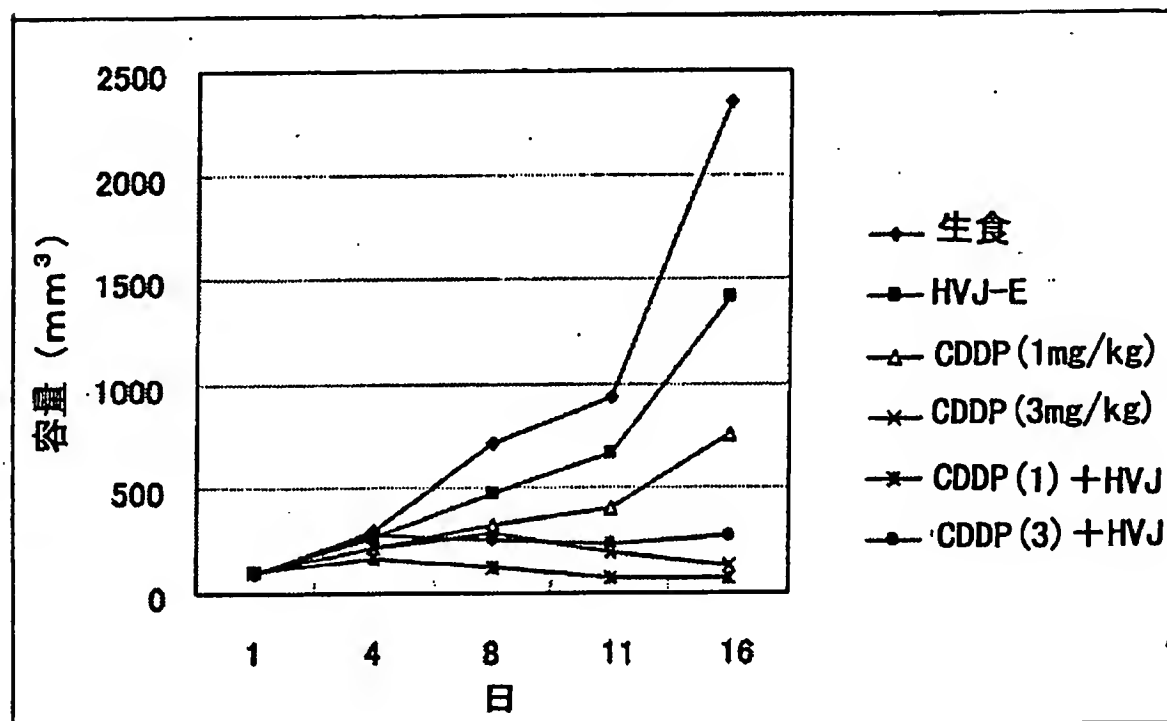


図 18 a

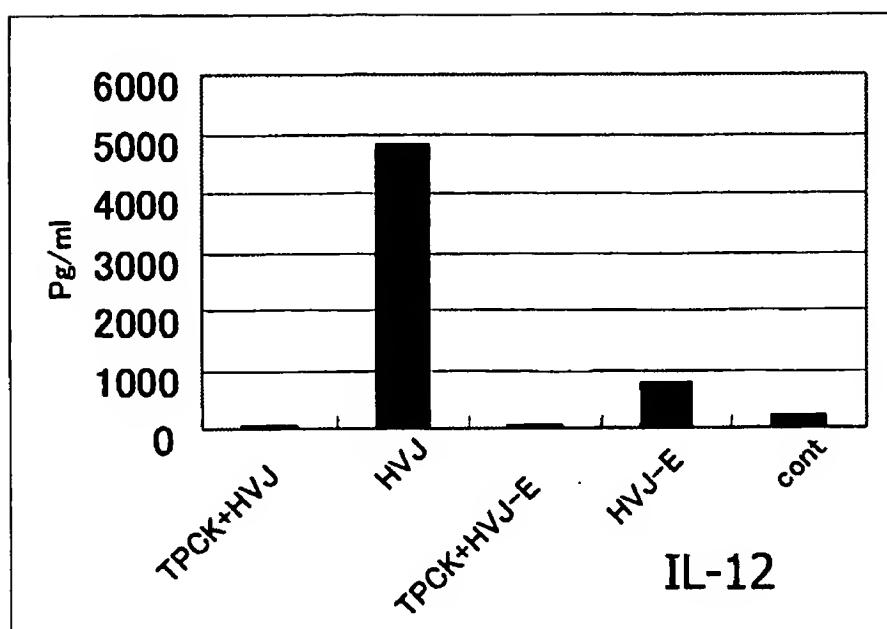


図 18 b

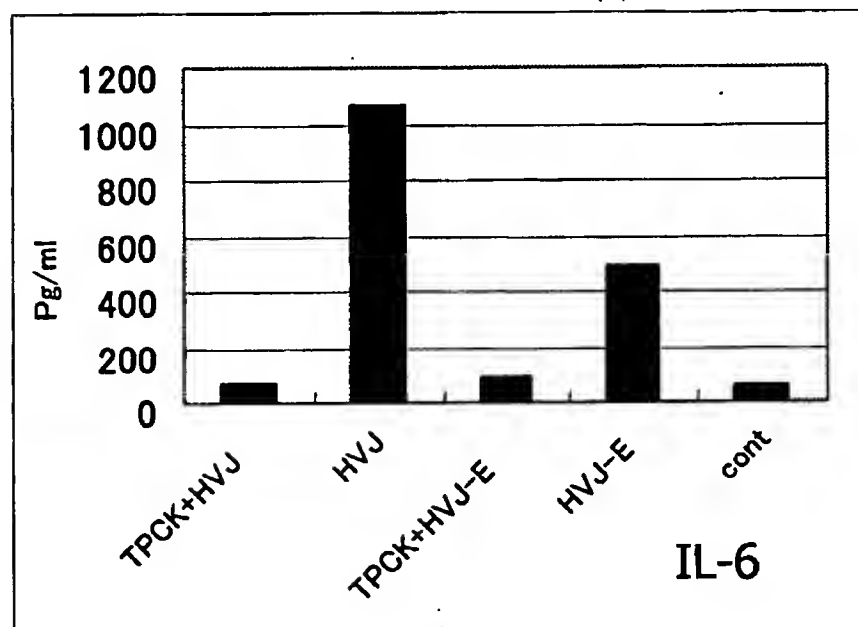


図 18 c

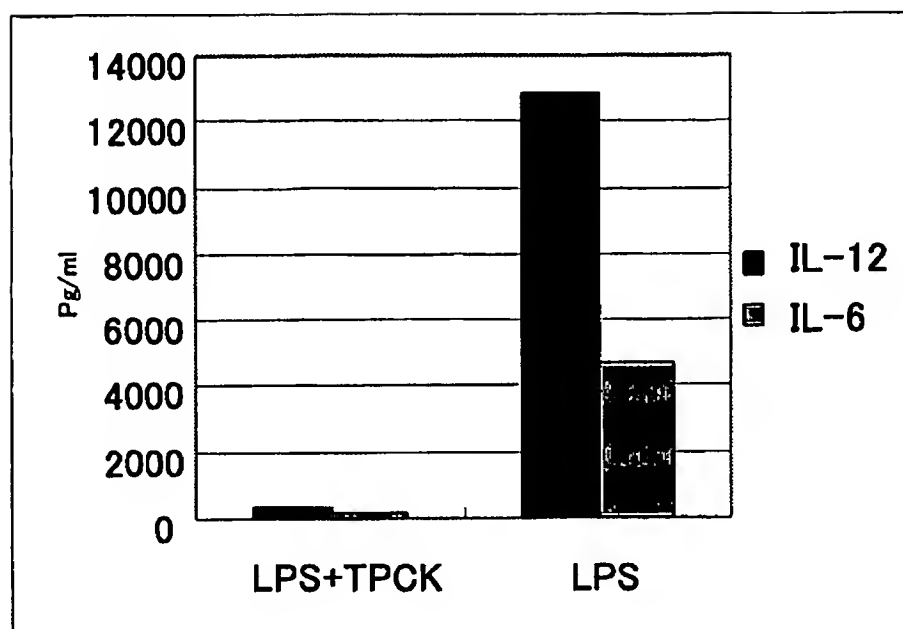


图 19

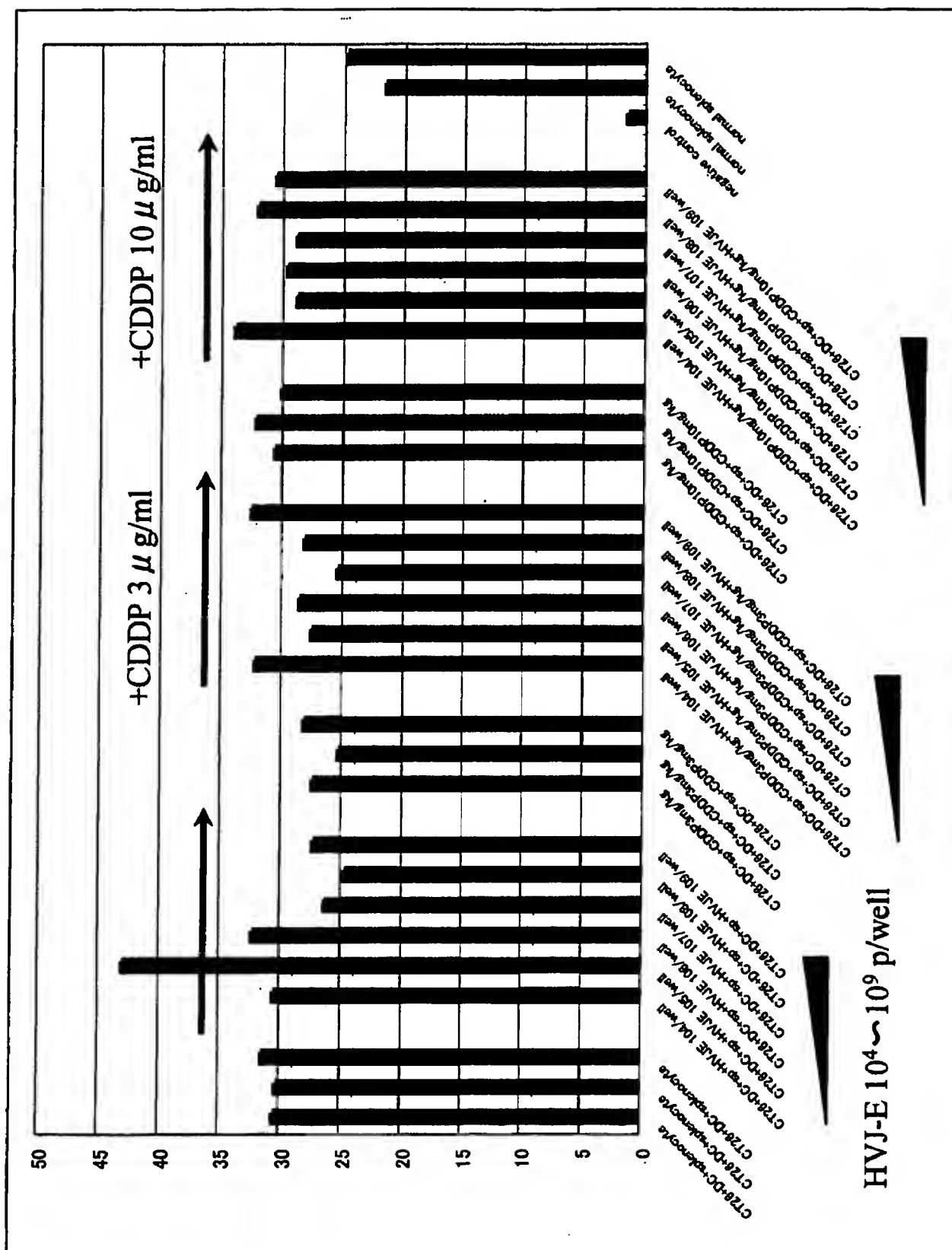


图 20

